

- 1 -

## 明細書

## 造血系疾患の治療用製剤

## 5 技術分野

本発明は、滑膜細胞蛋白質として単離されたシノビリオンおよびその遺伝子の利用に関し、具体的には造血系疾患の治療用製剤および治療方法等への利用に関する。

## 10 背景技術

小胞体 (ER) における蛋白質の品質管理、および核における蛋白質量の転写調節は、細胞の恒常性を維持する重要な過程である (Hampton, R. Y. 2002. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 476-482.)。真核細胞では、新たに合成される蛋白質は ER に輸送され、そこで正しくフォールディングされる。しかし、大量の蛋白質が ER に流入するなどの様々な環境条件により、この問題を克服するため、蛋白質のアンフォールディング応答 (URP) と称される細胞応答が引き起こされる (Welihinda, A. A., Tirasophon, W., and Kaufman, R. J. 1999. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr.* 7: 293-300.)。URP 応答中は、真核生物開始因子 (eIF) 2 $\alpha$  の不活化により新たな蛋白質の合成が全体的に阻害されて、ER ではミスフォールディングした蛋白質のさらなる蓄積が減少し、また Bip/Grp78 および Grp94 を含む ER シャペロン蛋白質をコードする遺伝子が上方制御されて、ミスフォールディングした蛋白質が正しくリフォールディングされる (Ron, D. 2002. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* 110: 1383-1388.)。URP にもかかわらず、ミスフォールディング

- 2 -

した蛋白質の量が蛋白質のフォールディング能力を超える場合には、ミスフォールディングした蛋白質は、ER 関連分解 (ERAD) として知られるユビキチンおよびプロテアソーム依存性分解過程により除去されなければならない (前掲 Hampton, 2002)。ER 内のミスフォールディングした蛋白質はサイトゾルに移行し、そこでユビキチンリガーゼ酵素により 26S プロテアソームの標的とされる。哺乳動物細胞の ERAD 系においては、CHIP (Hsc70 の C 末端相互作用蛋白質) (Ballinger, C. A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L. J., Yin, L. Y., and Patterson, C. 1999. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell Biol.* 19: 4535-4545. ; Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M., and Cyr, D. M. 2001. The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* 3: 100-105. ; Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., and Takahashi, R. 2001. An Unfolded Putative Transmembrane Polypeptide, which Can Lead Endoplasmic Reticulum Stress, Is a Substrate of Parkin. *Cell* 105: 891-902)、パーキン (Im Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K. I., and Takahashi, R. 2002. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell* 10: 55-67)、gp78/AMFR (Shimizu, K., Tani, M., Watanabe, H., Nagamachi, Y., Niinaka, Y., Shiroishi, T., Ohwada, S., Raz, A., and Yokota, J. 1999. The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. *FEBS Lett.* 456: 295-300. ; Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J. P., Tiwari, S., and Weissman, A. M. 2001. The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum.

- 3 -

*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 14422-14427)、および Fbx2/FBG1/NFB42 (Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. 2002. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 418: 438-442) を含  
5 む様々なユビキチンリガーゼが報告されており、ER において ERAD 系を制御する  
正確な機構を決定するため現在詳細な研究が行われている。

ERAD 系は、産生されるミスフォールディングした蛋白質の量を除去するため、細胞増殖中、恒常的に機能することが報告されている (Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., and Walter, P. 2000.  
10 Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101: 249-258.)。最近の研究により、UPR および/または ERAD 系の機能破壊が、ER における適切な蛋白質フォールディングを妨げることが知られている (Lee, A. S. 2001. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical  
15 applications. *Trends Biochem. Sci.* 26: 504-510.) ある ER ストレス誘導性化学物質で処理した細胞のカスパーゼ依存性アポトーシスを亢進し得ることが示された (Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific  
apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98-103.)。これら  
20 の結果は、ERAD 系の破壊に起因するある種のヒト疾患の分子論的病原機構を説明し得る。例えば、伸長したポリグルタミンの産生によりある遺伝性神経変性障害が生じ (Jana, N. R., Zemskov, E. A., Wang, G. h., and Nukina, N. 2001. Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase  
25 activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.* 10: 1049-1059. ; Bence, N. F., Sampat, R. M., and Kopito, R. R. 2001.

- 4 -

Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292: 1552-1555. ; Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A. H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., Uchiyama, Y., Hori, S., and Kakizuka, A. 2001. VCP/p97 in  
5 abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death. Differ.* 8: 977-984.)、または ERAD 系の有名なユビキチンリガーゼ蛋白質であるパーキン遺伝子の変異は、常染色体劣性若年性パーキンソニズム (AR-JP) を有する患者において黒質の神経細胞死を生じると考えられている (Imai, Y., Soda, M., and  
10 Takahashi, R. 2000. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* 275: 35661-35664.)。これらの知見は、生理的および病的状態での細胞生存における ERAD 系の重要性を強調するものである。

最近、我々は、抗滑膜細胞抗体を用いた免疫スクリーニングにより、RING-H2  
15 モチーフを有する ER 常在性膜蛋白質である酵母ユビキチンリガーゼ (E3) Hrd1p/Del3 (Bays, N. W., Gardner, R. G., Seelig, L. P., Joazeiro, C. A., and Hampton, R. Y. 2001. Hrd1p/Del3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat. Cell Biol.* 3: 24-29.) のヒト相同体であるシノビオリン/HRD1 (以下、略して「シノビオリン」という) を  
20 クローニングした。

上述の通り抗滑膜細胞抗体を用いた免疫スクリーニングから得られたということは、シノビオリンが関節リウマチ (以下、「RA」と略す) の発症に深く関与することを示唆するものである。また、実際に変形性関節症患者の滑膜組織ではシノビオリンはほとんど発現していないにもかかわらず、RA 患者の滑膜組織では  
25 強く発現していることが明らかとなっている。また、このシノビオリン遺伝子を過剰発現させたマウスでは滑膜増生、骨・軟骨破壊を伴うリウマチ様症状を呈す

- 5 -

ることも報告されており、シノビオリンと RA の関与を裏付ける結果となっている。

一方、シノビオリンの yeast homolog の Hrd1p は、虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、ウイルス感染、小胞体内腔のカルシウム濃度低下などといったストレスにより小胞体内で生じ蓄積した異常構造蛋白質を除去し、小胞体の破綻を回避する分子の 1 つとして知られている。この小胞体ストレス応答機構としては、①小胞体内シャペロン分子やフォールディング酵素の転写誘導、②蛋白質の翻訳抑制、③ユビキチン・プロテアソーム系による異常蛋白質の積極的分解の 3 つがあり、通常①②をあわせて UPR (unfolded protein response)、③を ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) と呼び、yeast Hrd1p は③の ERAD に関与する。このような危機管理機構である UPR や ERAD をもっても対処できない過度のストレスを受けると、細胞は自らアポトーシスを選ぶこととなり、また ERAD の破綻も同様にしてアポトーシスを誘導する結果となる。

同様にシノビオリンは、E3 活性を持つこと、また細胞内においては ER で発現がみられることから、yeast Hrd1p と同様に ERAD に関与し小胞体ストレス応答機構の一端を担っている。

### 発明の開示

本願発明者らは上述のように小胞体ストレス応答機構のうち ERAD に関与し、品質管理リガーゼとして機能していると考えられているシノビオリンのノックアウトマウスを作成し、その生体内における機能を解明することを試みた。

解析の結果、シノビオリンノックアウトマウスは E12.5-E13.5 で胎生致死となった。この原因を探るために胎仔の組織を詳細に調べたところ、肝臓でのアポトーシスが亢進し、これにより細胞密度低下が起こっていることが明らかとなった。数多く存在するユビキチンリガーゼの 1 つであるシノビオリンの機能を欠損させることが、マウスの発生段階における致死性をもたらしたことは非常に驚くべき

- 6 -

ことであり、このことはこれまでに予期することのなかった全く新しい知見となった。そこで、このシノビオリンノックアウトマウスについてさらなる検討を進めた結果、このマウスでは造血系において異常が認められ、またマクロファージが活性化され血球貪食が増加していることが明らかとなった。つまり、シノビオリンノックアウトマウスで亢進したアポトーシスは、その結果の1つとして赤芽球分化異常をもたらし、これにより増加した異常な赤芽球を排除するためにマクロファージが活性化され、血球数の減少により貧血を引き起こし、この時期に致死となることが証明された。またこのアポトーシスの亢進は胎仔由来の線維芽細胞（以下「MEFs」と略す）を用いた検討から、予測した通り小胞体ストレスによって誘導されたものであることも明らかとなっている。この結果は、換言すればマウスの発生において小胞体ストレスが二次造血の場で強く負荷されていることを示唆するものであり、また ERAD の破綻がマウスへの致死性をもたらすというこれまでにない全く新しい知見となっている。また先に述べたように、ERAD においてはユビキチンリガーゼのなかでもこのシノビオリンという因子が特に重要な役割を果たすことが本研究によりはじめて明らかとなった。

これまでに我々は RA の発症にシノビオリンが関与するという報告もしており、ERAD において主要な役割を担っているシノビオリンの機能を標的とすることで、この疾患への治療が可能になるものと考えられる。また造血系疾患および RA のみならず、小胞体ストレス誘導性のアポトーシスに関連した疾患への治療などといった効果も予測され、本研究が新たな創薬開発への足がかりとなることが期待される。

上記知見に基づき本発明は、以下に示す造血系疾患の治療用薬剤および治療方法、さらには造血系疾患の治療用薬剤のスクリーニング方法を提供する。

[1]以下の(a) - (d) からなる群から選択されるいずれかの蛋白質またはそれをコードするポリヌクレオチドを投与する工程を含む、造血系疾患の治療方法。

- 7 -

- (a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、
- (b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質
- 5 (c) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされ、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質
- 10 (d) 配列番号：1 に記載の塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質
- [2]造血系疾患が、赤芽球の分化異常に起因する疾患である上記[1]に記載の方法。
- 15 [3]前記ポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクターを、造血幹細胞に導入する工程を含む、上記[1]に記載の方法。
- [4]造血幹細胞において、以下の(a)－(d)からなる群から選択されるいずれかの蛋白質を発現させる工程を含む、赤芽球を分化させるための方法。
- (a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、
- 20 (b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質
- (c) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされ、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能
- 25

- 8 -

的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：1に記載の塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

5 [5]以下の(a) - (d)からなる群から選択されるいずれかの蛋白質またはそれをコードするポリヌクレオチドを有効成分として含有する、造血系疾患の治療用医薬製剤。

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、

10 (b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(c) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされ、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

15 (d) 配列番号：1に記載の塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

20 [6]前記ポリヌクレオチドを発現可能に保持した造血幹細胞である、上記[5]に記載の医薬製剤。

[7]配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の活性増強剤を投与する工程を含む、造血系疾患の治療方法。

25 [8]配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の活性増強剤を有効成分として含有する、造血系疾患の治療剤。

[9]シノビオリン遺伝子機能が欠損している、造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔。



- 9 -

[10] 非ヒト動物がげっ歯目動物である、上記[9]記載の造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔。

[11] げっ歯目動物がマウスである、上記[10]記載の造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔。

5 [12] 13.5 日齢以前の胎仔である、上記[11]記載の造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔。

[13] 造血系疾患が赤芽球の分化異常に起因する疾患である、上記[9]記載の造血系疾患モデル非ヒト動物。

10 [14] 上記[9]から[13]のいずれかに記載の造血系疾患モデル動物胎仔由来の造血系疾患モデル細胞。

[15] 線維芽細胞である、上記[14]記載の造血系疾患モデル細胞。

[16] シノビオリン遺伝子機能が欠損している造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔に被験物質を投与し、該非ヒト動物胎仔における赤芽球の状態を評価する、造血系疾患の治療剤のスクリーニング方法。

15 [17] 以下 (a) から (c) の工程を含む、造血系疾患の治療剤のスクリーニング方法。

(a) シノビオリン遺伝子機能が欠損している造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔または当該胎仔由来細胞に ER ストレス誘導剤を投与または接触させる工程、

20 (b) 上記(a)工程の前後又は同時に前記シノビオリン遺伝子機能が欠損している造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔または前記胎仔由来細胞に被験物質を投与または接触させる工程、

(c) 前記非ヒト動物胎仔または胎仔由来細胞におけるアポトーシスが誘導された細胞を測定する工程

25 [18] 以下 (a) から (c) の工程を含む、ER ストレス除去剤のスクリーニング方法。

- 10 -

(a) 内在シノビオリン遺伝子機能が欠損している細胞に ER ストレス誘導剤を作用させる工程、

(b) 上記(a)工程の前後又は同時に前記細胞に被験物質を接触させる工程、

5 (c) 前記細胞におけるアポトーシスが誘導された細胞を測定する

本発明は第一に、シノビオリン蛋白質またはそれをコードしたポリヌクレオチドを利用した造血系疾患の治療方法を提供する。シノビオリンノックアウトマウスを用いた研究からシノビオリンが造血、特に赤芽球の分化過程に關与することが示されている。そのため本発明の方法は、造血系疾患、特に赤芽球の分化過程  
10 の異常が原因となる疾患、例えば、貧血の有効な治療方法となり得る。

本発明の方法に用いることができるシノビオリン蛋白質として、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質を先ず挙げることができる。この蛋白質は、配列番号：1に示す塩基配列の蛋白質コード領域にコードされる。シノビオリン  
15 をコードするポリヌクレオチドは、公知の方法によりクローニングすることができる (Nucleic Acid Res. 16:7583-7600, 1988)。シノビオリンはRA患者の滑膜細胞において強く発現していることを本願発明者が見出していることから、RA患者の関節炎を発症した組織に由来する滑膜細胞から抽出したmRNAをもとに得られたcDNAライブラリーから (Nucleic Acid Research, 16, 7583, 1988)、配列番号：1に示した塩基配列に基づいて設定したプローブを用いて、ハイブリダイズ  
20 するクローンをスクリーニングすることによってシノビオリン遺伝子を単離することができる。シノビオリン蛋白質は、RA患者の滑膜細胞からシノビオリン抗体やリガンド (SL (S1-5) など) などのシノビオリンと親和性を有する物質 (Leck a-Czernik, B. et al., Mol. Cell. Biol. 15, 120-128, 1995; Heon, E. et al., Arch. Ophthalmol. 114, 193-198, 1996; Ikegawa, S. et al., Genomics 35, 5  
25 90-592, 1996; Katsanis, N. et al., Hum. Genet. 106, 66-72, 2000; Giltay,

- 11 -

R. et al., Matrix Biol. 18, 469-480, 1999; Stone, E. M. et al., Nat. Gene t. 22, 199-202, 1999) を用いて単離・精製してもよく、また、配列番号 1 記載の塩基配列を発現ベクターなどに接続し、適当な宿主細胞内で発現させることにより合成してもよい。

- 5      また、本発明では上述した配列番号 2 に記載の配列からなるシノビリオン蛋白質に限定されず、これと機能的に同等な蛋白質も含まれる。シノビオリン蛋白質の機能として、本発明では ER ストレスによる造血系細胞のアポトーシスを回避させ得る機能を有していればよい。

- 10      シノビオリンと機能的に同等な蛋白質としては、(1) 上述した配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する蛋白質、(2) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされた蛋白質、(3) 配列番号：1 に記載の塩基配列と少なくとも 70% 以上の相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされた蛋白質、が挙げられる。

15      これらシノビオリンと機能的に同等な蛋白質と配列番号 2 に記載のシノビオリン蛋白質との間の非相同なアミノ酸の数は、一般的には 50 アミノ酸以内であり、好ましくは 30 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 5 アミノ酸以内（例えば、1 アミノ酸）であると考えられる。

- 20      シノビオリンと機能的に同等な蛋白質を得るためにアミノ酸を人為的に置換する場合、性質の似たアミノ酸に置換すれば、もとの蛋白質の活性が維持されやすいと考えられる。保存的置換は、蛋白質の活性に重要なドメインのアミノ酸を置換する場合などにおいて重要であると考えられる。このようなアミノ酸の保存的置換は、当業者にはよく知られている。

- 25      保存的置換に相当するアミノ酸のグループとしては、例えば、塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギ

- 1 2 -

ン酸、グルタミン酸)、非荷電極性アミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性アミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 $\beta$ 分岐アミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族アミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)などが挙げられる。

また、非保存的置換により蛋白質の活性などをより上昇(例えば恒常的活性化型蛋白質などを含む)または下降させることも考えられる。活性が低下しても造血系細胞におけるアポトーシスをレスキューし得る活性を有する限り、機能的に同等な蛋白質に含まれる。

シノビオリンと機能的に同等な蛋白質を得る方法として、ハイブリダイゼーションを利用する方法を挙げることができる。すなわち、配列番号：1に示すような本発明によるシノビオリンをコードするポリヌクレオチド、あるいはその断片をプローブとし、これとハイブリダイズするポリヌクレオチドを単離する。ハイブリダイゼーションをストリンジेंटな条件下で実施すれば、塩基配列としては相同性の高いポリヌクレオチドが選択され、その結果として単離される蛋白質にはシノビオリンと機能的に同等な蛋白質が含まれる可能性が高まる。相同性の高い塩基配列とは、たとえば70%以上、望ましくは90%以上の同一性を示すことができる。

上記ストリンジेंटな条件とは、具体的には例えば 6×SSC、40%ホルムアミド、25℃でのハイブリダイゼーションと、1×SSC、55℃での洗浄といった条件を示すことができる。ストリンジエンシーは、塩濃度、ホルムアミドの濃度、あるいは温度といった条件に左右されるが、当業者であればこれらの条件を必要なストリンジエンシーを得られるように設定することは自明である。

ハイブリダイゼーションを利用することによって、たとえばヒト以外の動物種におけるシノビオリンのホモログをコードするポリヌクレオチドの単離が可能で

- 13 -

ある。ヒト以外の動物種、すなわちマウス、ラット、ウサギ、ブタ、あるいはヤギ等の動物種から得ることができるポリヌクレオチドがコードするシノビオリンのホモログは、本発明における機能的に同等な蛋白質を構成する。

実際に本発明者らは、本発明のシノビオリン遺伝子を複数の個体からクローニ  
5     ングし、その塩基配列を決定することによって、1アミノ酸を欠失したクローン  
を得ている。このようなアミノ酸配列に変異を含む蛋白質、並びにそれをコード  
する塩基配列からなるポリヌクレオチドは、本発明にシノビオリンと機能的に同  
等な蛋白質またはこれをコードしたポリヌクレオチドに含まれる。なお、本発明  
者らが確認した1アミノ酸を欠失したクローンの塩基配列を配列番号：3に、そ  
10     してこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号：4に示した。  
配列番号：3の塩基配列は、配列番号：1における1293-1295に相当するgcaを欠  
損している。その結果、配列番号：4に記載のアミノ酸配列は、配列番号：2に  
おける412位のAlaを欠損している。

ヒトシノビオリン（配列番号：2）に変異を導入して得た蛋白質や、上記のよ  
15     うなハイブリダイゼーション技術等を利用して単離されるポリヌクレオチドがコ  
ードする蛋白質は、通常、ヒトシノビオリン（配列番号：2）とアミノ酸配列に  
おいて高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも30%以上、好ましくは5  
0%以上、さらに好ましくは80%以上（例えば、95%以上）の配列の同一性を指す。  
塩基配列やアミノ酸配列の同一性は、インターネットを利用したホモロジー検索  
20     サイトを利用して行うことができる [例えば日本DNAデータバンク（DDBJ）におい  
て、FASTA、BLAST、PSI-BLAST、および SSEARCH 等の相同性検索が利用できる  
[例えば日本DNAデータバンク（DDBJ）のウェブサイトの相同性検索（Search and  
Analysis）のページ；<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>]。  
また、National Center for Biotechnology Information (NCBI) において、BLAS  
25     Tを用いた検索を行うことができる（例えばNCBIのホームページのウェブサイトの  
BLASTのページ；<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>；Altschul, S.F. et al.,

- 14 -

J. Mol. Biol., 1990, 215(3):403-10; Altschul, S.F. & Gish, W., Meth. Enzymol., 1996, 266:460-480; Altschul, S.F. et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402) ]。

例えば Advanced BLAST 2.1におけるアミノ酸配列の同一性の算出は、プログラムにblastpを用い、Expect値を10、Filterは全てOFFにして、MatrixにBLOSUM62を用い、Gap existence cost、Per residue gap cost、および Lambda ratioをそれぞれ 11、1、0.85（デフォルト値）に設定して検索を行い、同一性（identity）の値（%）を得ることができる（Karlin, S. and S. F. Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68; Karlin, S. and S. F. Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7）。

上述したシノビオリンと機能的に同等な蛋白質が、実際にシノビオリンと同等な機能を有するかを確認する方法としては、本願実施例に示す相補実験が挙げられる。具体的には、シノビオリンホモノックアウト胎仔由来のMEFsをERストレス剤で処理し、上述した機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを投与し、ERストレス剤によるアポトーシス誘導が抑制されるかを指標として、機能的に同等であることを確認することができる。

本発明の造血系疾患の治療方法では、シノビオリンまたはこれと機能的に同等な蛋白質をコードしたポリヌクレオチドを用いることができる。ポリヌクレオチドは、その由来を問わない。すなわち、cDNA、ゲノムDNAのほか、合成によって得ることもできる。上記ポリヌクレオチドを治療に用いる場合、遺伝子治療用ベクター、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどに組み込んでもよい。

これらの蛋白質またはポリヌクレオチドを用いて造血系疾患の治療を行う場合、上記蛋白質またはポリヌクレオチドを直接患者に投与してもよいが、好ましくはポリヌクレオチドを造血幹細胞へ導入し、ポリヌクレオチドを安定に保持した造血幹細胞を選択して患者に移植することである。造血幹細胞へのポリヌクレオチド

- 15 -

の導入の際、ポリヌクレオチドは上述のように遺伝子治療用ベクターなどに保持させてもよい。

また、これら蛋白質またはポリヌクレオチドを用いて造血系疾患の治療を行う場合、上記蛋白質またはポリヌクレオチドをそのまま用いる他、公知の製剤学的

5 方法により製剤化して医薬製剤として用いもよい。

医薬製剤化の際、上述したポリヌクレオチドや蛋白質などの有効成分以外に適宜他の溶質や溶媒と組み合わせることができる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。本発明の医薬組成物  
10 物は、水溶液、錠剤、カプセル、トローチ、バツカル錠、エリキシル、懸濁液、シロップ、点鼻液、または吸入液などの形態であり得る。化合物の含有率は適宜決定すればよい。患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射、経口投与、関節内注入、その他の当業者に公知の方法により行い  
うる。

15 投与量は、患者の体重や年齢、投与方法、症状などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。一般的な投与量は、薬剤の有効血中濃度や代謝時間により異なるが、1日の維持量として約0.1mg/kg～約1.0g/kg、好ましくは約0.1mg/kg～約10mg/kg、より好ましくは約0.1mg/kg～約1.0mg/kgであると考えられる。投与は1回から数回に分けて行うことができる。

20 また、上述したシノビオリンまたはこれと機能的に同等な蛋白質をコードしたポリヌクレオチドが導入された造血幹細胞を医薬製剤としてもよい。造血幹細胞を得るには、骨髓または他の造血源から多能性のヒト幹細胞を単離することが必要である。まず、骨髓細胞は骨髓源、例えば腸骨稜、脛骨、大腿骨、脊椎または他の骨腔(bone cavity)から得ることができる。造血幹細胞の他の入手源は胚卵  
25 黄包、胎児肝臓、胎児及び成人の脾臓、成人末梢血液及び臍帯血をはじめとする血液を包含する。

- 16 -

これらの組織からの造血幹細胞の取得は、Herzenberg, L.A. 「Weir's Handbook of Experimental Immunology, 5th edition」, Blackwell Science Inc. 1997 に従い実施することができる。すなわち、抗 CD34 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD38 抗体などを用いて免疫学的に染色し、セルソーターを用いてこれらの抗

5 体の染色性により分離することができる。

造血幹細胞が単離されたら、それらは次のようにして増殖させることができる。すなわち、骨髓細胞、胎仔胸腺または胎仔肝臓から得られるストローマ細胞との共存培養により幹細胞維持と関連する成長因子が提供され、造血幹細胞を増殖させることができる。

- 10 造血幹細胞または造血前駆細胞に治療用遺伝子を導入するには、通常動物細胞の遺伝子導入に用いられる方法、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、HIV ベクター等のウイルス由来の遺伝子治療に用いられる動物細胞用ベクターを用いる方法、リン酸カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、リポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法等を用いることができる。
- 15

- 上記医療方法または医療製剤によれば、患者の体内にシノビオリンは補足され、これにより ER ストレス誘導性アポトーシスが抑制され赤芽球の分化異常などが解消または低減されることになる。その結果、造血過程の異常、例えば赤芽球の
- 20 分化異常が起因した疾患の治療が期待される。

- 本発明はまた、シノビオリンの活性を増強し得る物質を利用した造血系疾患の治療方法および治療用製剤に関する。本願発明者らにより天然シノビオリンリガンド (SL) が単離されている。SLは、S1-5と呼ばれる公知の遺伝子 (Lecka-Czerwik, B. et al., Molecular and Cellular Biology, 15, 120-128, 1995) と、D
- 25 NAの部分配列のみならず遺伝子の大きさ、発現産物の分子量などがほぼ同じであり、同一の蛋白質である可能性が高い。他のSLとしては accession number AAA65



- 17 -

590 (nucleotide accession U03877)、I38449、NP\_061489 (nucleotide accession NM\_018894)、NP\_004096 (nucleotide accession NM\_004105)、またはそれらに類似したタンパク質であってヒトシノビオリンタンパク質（配列番号：2）に結合する活性を有するタンパク質を用いることができる（Lecka-Czernik, B. et al., Mol. Cell. Biol. 15, 120-128, 1995; Heon, E. et al., Arch. Ophthalmol. 114, 193-198, 1996; Ikegawa, S. et al., Genomics 35, 590-592, 1996; Katsanis, N. et al., Hum. Genet. 106, 66-72, 2000; Giltay, R. et al., Matrix Biol. 18, 469-480, 1999; Stone, E. M. et al., Nat. Genet. 22, 199-202, 1999）。

- 10      このようなシノビオリンリガンドまたはこれをコードしたポリヌクレオチドなどのシノビオリンの活性を刺激し得るシノビオリン活性増強剤は、シノビオリンの低下した機能に起因した造血系疾患の治療方法に利用し得る。

15      こうしたシノビオリンリガンドを医薬製剤とする場合、SL 蛋白質やこれをコードするポリヌクレオチドなどもまた、上述のように有効成分以外に適宜他の溶質や溶媒と組み合わせることができる。また、SL をコードしたポリヌクレオチドが導入された造血幹細胞を医薬製剤としてもよい。

上記発明によれば、シノビオリンリガンドの投与により、シノビオリンの発現または活性の向上が図られる。その結果、シノビオリンの発現または活性低下が関与する造血系疾患の治療が期待される。

- 20      本発明は、シノビオリンを利用した赤芽球を分化させるための方法に関する。上述したようにシノビオリンをホモで欠損した胎仔では赤芽球の分化異常が観察されている。そのため、シノビオリンならびにこれと機能的に同等な蛋白質およびこれらをコードしたポリヌクレオチドは赤芽球を分化させるための試薬および方法に利用し得る。

- 25      赤芽球を分化させるための方法は、造血幹細胞に上述したシノビオリンまたはこれと機能的に同等な蛋白質を投与するか、細胞内で発現させることにより実施

- 18 -

し得る。シノビリオンまたはこれと機能的に同等な蛋白質をコードしたポリヌクレオチドを発現ベクターに担持させ、これを造血幹細胞に導入する。造血幹細胞の単離、使用し得る発現ベクターの種類、導入方法などは上述したとおりである。シノビリオン等をコードしたポリヌクレオチドを導入した後、細胞を培養し、形態を観察して赤芽球に分化した細胞を採取する。また、シノビオリンとともに他の赤芽球を分化誘導し得る物質を組み合わせ用いてもよい。例えばエリスロポエチンを赤芽球分化誘導剤として単独で用いた場合CFU-Eに分化することが知られており、エリスロポエチンにSCFを組合せて用いるとBFU-Eに分化することが知られている。このように他の誘導剤と組合せることにより単独で用いた場合と異なる細胞を分化誘導し得る可能性がある。

上述したように上記シノビリオンまたはこれと機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド、またはこれを担持した発現ベクターは赤芽球の分化誘導剤など試薬として応用し得る。

本発明はシノビオリン遺伝子機能が欠損した、造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔に関する。シノビリオンの機能解析のためにノックアウトマウスの作成を試みたが、シノビオリンをホモで欠損させると13.5日齢程度で胎生致死となる。致死に至る以前の胎仔を用いた解析では、アポトーシスが亢進し、赤芽球の分化異常が観察され、この異常細胞によりマクロファージが活性化、血球貪食も観察された。したがって、シノビオリンホモノックアウト胎仔は、造血系疾患、とりわけ赤芽球の分化異常が起因する疾患のモデル胎仔となり得る。また、この赤芽球の分化異常は、ERストレス誘導性アポトーシスが主要因と考えられることから、シノビオリンホモノックアウト胎仔はERストレス誘導性アポトーシスが起因した疾患のモデルにもなり得る。

本発明のモデル非ヒト動物としては、哺乳動物（例えばマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ならびにウシ等）が好ましく、特にげっ歯類、例えばマウスまたはラットなどを用いることが好適である。

- 19 -

- シノビオリン遺伝子機能が欠損した非ヒト動物は、例えば、ジーンターゲティングにより製造することができる。このようなモデル非ヒト動物を作製するには、例えば本発明のDNAの一部または全部を置換、欠失、付加および／または挿入等により欠損させたターゲティングベクターを胚性幹(ES)細胞に導入し、染色体DNAと
- 5 相同組み換えを起した細胞を選択する。相同組み換え体の選択のためには公知のポジティブ・ネガティブ選択を行うことができる。ポジティブ選択用マーカーとしては、ネオマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子、ネガティブ選択用マーカーとしては、ジフテリア毒素(DT)-A遺伝子や HSV-tk遺伝子などが挙げられる。サザンブロッティングやPCR等により、正しく組み換えられた細胞を選択すること
- 10 ができる。得られた細胞は、8細胞期程度の受精卵または胚盤胞の胚盤胞腔などに注入し、輸精管結紮雄と交配させて作製した偽妊娠メス個体の子宮内に移植する。産仔のゲノムDNA解析は後述する実施例に基づいて実施することができる。産仔より血液または組織などの試料を得、この取り出した試料を基にDNA解析を行う。このDNA解析から、ヘテロノックアウトマウスであるか否かを同定し得る。
- 15 ホモノックアウトマウスを得るためには、ヘテロノックアウトマウス同士を交配させる。上記と同様に交配の結果として得られた胎仔のDNA解析を行い、ホモノックアウトマウスを同定する。なお、マウスの場合には、ホモノックアウト型は13.5日齢頃に致死となった。そのため、生存しているマウス胎仔を得るためには、それ以前に子宮より摘出する。
- 20 シノビオリン機能欠損動物の創生は、シノビオリン遺伝子をノックアウトするだけでなく、このノックアウトと共に他の遺伝子をノックインすることもできる。ノックインする遺伝子に特に制限はない。例えばlacZ遺伝子等のマーカー遺伝子が挙げられる。

また、シノビオリンの機能を欠損させる手段としては、ジーンターゲッティング

25 の他にも、アンチセンス法、リボザイム法またはiRNA法などにより、染色体DNA上のシノビオリン遺伝子を改変させずに、転写後の発現を阻害することで機能をオ

- 20 -

フさせる手段を用いてもよい。アンチセンス法においては、本発明の蛋白質をコードするDNAの転写産物に相補的なRNAをコードするDNAを含むベクターを、また、リボザイム法においては、例えば本発明の蛋白質をコードするDNAの転写産物を切断するRNAをコードするDNAを含むベクターを、上記と同様に哺乳動物の胚性幹細胞に導入し、これを哺乳動物の胚に注入し、該胚から個体を得ればよい。

また、iRNA法は、シノビリオン蛋白質をコードするDNA、例えば、配列番号1に記載の配列からなる転写産物に相補的なアンチセンスRNAおよびこのアンチセンスRNAと相補するセンスRNAとが対合した二重鎖RNAを発現するベクターを、上記と同様に哺乳動物の胚性幹細胞に導入し、これを哺乳動物の胚に注入し、該胚から個体を得ればよい。

上記の通り、シノビリオンの機能を欠損した胎仔は、赤芽球の分化異常という性質を呈する。このような性質の発現は、10.5日齢以降である。そのため、10.5日齢以降であって致死に至る13.5日齢以前の胎仔は、造血系疾患、とりわけ赤芽球の分化異常に起因した疾患のモデルとなる。また、胎仔そのものだけではなく、胎仔由来の細胞もまた、モデル細胞として利用し得る。胎仔由来の細胞として好適な例は、MEFsなどである。これらモデル動物胎仔やこれに由来する細胞は、造血系疾患、特に赤芽球分化異常に起因した疾患に対する医薬候補化合物を含む種々の化合物の試験またはスクリーニングを行うことができる。本発明のモデル動物胎仔を利用した試験またはスクリーニングの方法としては、以下の方法が挙げられる。

本発明の造血系疾患用治療剤のスクリーニング方法は、シノビオリン遺伝子機能が欠損している造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔もしくは母体に被験物質を投与し、該非ヒト動物胎仔における赤芽球の状態を評価する。赤芽球が野生型と比較して同等程度に正常に分化しているか、あるいはホモノックアウト胎仔と比較して分化異常を示す数が低減している場合に、被検物質は造血系疾患の治療剤の候補となる。

- 21 -

また、別の態様のスクリーニング方法としては、以下（a）から（c）の工程を含む、スクリーニング方法が挙げられる。

（a）シノビオリン遺伝子機能が欠損している造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔  
または当該胎仔由来細胞に ER ストレス誘導剤を投与または接触させる工  
5 程

（b）上記（a）工程の前もしくは後又は同時に前記シノビオリン遺伝子機能が  
欠損している造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔または前記胎仔由来細胞に  
被験物質を投与または接触させる工程

（c）前記非ヒト動物胎仔または胎仔由来細胞におけるアポトーシスが誘導され  
10 た細胞を測定する工程

上記スクリーニング方法における造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔は、上述し  
たシノビリオンの機能を欠損させたモデル胎仔を用いることができる。胎仔由来  
の細胞は、モデル胎仔から採取した細胞、好適には、MEFsを用いることができる。

これらモデル胎仔または胎児由来の細胞に作用させるERストレス剤は、例えば、  
15 ツニカマイシン、タプシガルギン、その他のERストレスを誘導し得る薬剤を用い  
ることができる。これらERストレス剤により胎仔または胎仔由来の細胞にERスト  
レスを加える。

ERストレス剤によりストレス誘導は、胎仔に直接投与するか、胎仔を生育して  
いるカルチャー内に投与することにより実施し得る。また、胎仔由来の細胞への  
20 ストレス誘導は、細胞を培養しているカルチャー内にERストレス剤を添加するこ  
とにより実施し得る。

上記ERストレス誘導工程の前もしくは後又は同時に、前記モデル胎仔または前  
記胎仔由来細胞に被験物質を投与または接触させる。この被験物質投与・接触方  
法は、被験物質の種類などにより、適宜選択することができる。胎仔への投与は、  
25 例えば胎仔を生育させるカルチャー内に添加してもよく、直接、体内に注入して  
もよい。細胞の場合には、被験化合物は例えば培地中に添加される。または、マ

- 22 -

イクロインジェクション等により細胞内に注入されてもよい。被験物質が遺伝子である場合は、naked DNAとして、所望のトランスフェクション試薬と組み合わせ、あるいは公知の発現ベクターに組み込んで細胞に遺伝子を導入することができる。

- 5      上記被験物質を作用させた後、非ヒト動物胎仔または胎仔由来細胞におけるアポトーシスが誘導された細胞を測定する。アポトーシス細胞の測定は、実施例に示したTUNELアッセイにより行うことができる。TUNELアッセイは市販のキットなどを用いて実施し得る。アポトーシス細胞の測定後、被験物質を作用させた群と、作用させていない群とのアポトーシス細胞数を比較する。ここで被験物質を作用
- 10      させた群において、アポトーシス細胞数の有意な減少が見られたとき、当該被験物質はERストレス誘導を抑制する活性を有し、赤芽球の正常な分化を誘導し得るものと判定される。

- なお、上記スクリーニングに用いる被験化合物は特に制限はなく、無機化合物、有機化合物、ペプチド、蛋白質、天然または合成低分子化合物、天然または合成
- 15      高分子化合物、組織または細胞抽出液、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などが挙げられるがこれらに制限されない。遺伝子ライブラリーの発現産物または発現cDNAライブラリーなどを用いることもできる。

        本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

20

#### 図面の簡単な説明

- 図 1 は、シノビオリン遺伝子の標的破壊を示す図および写真である。図 1(A)は、シノビオリン野生型アレル、ターゲティングベクター、ターゲティングされたアレルの構造、およびターゲティング前後の遺伝子の部分的な制限酵素地図を示す図である。遺伝子のエキソンは黒四角で示し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子
- 25      (LacZ)、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (Neo)、ジフテリア毒

- 23 -

素 A 遺伝子 (DT)、および pBluescript II (BSK) は白四角で示した。用いた制限酵素部位を以下のように示す：B、BglII；P、PstI；E、EcoRI；X、XhoI；N、NcoI。図 1 (B) は、ターゲティングした ES クローンおよびヘテロノックアウト（以下「 $\text{syno}^{+/-}$ 」と表示する）マウス同士の交配により生じた胎児クローンの

5 サザンブロット解析を示す写真である。野生型（以下、「 $\text{syno}^{+/+}$ 」と表示する）TT2 ES 細胞 (WT) および相同的ターゲティングされた ES クローン（クローン-1、クローン-2）のゲノム DNA を BglII で消化し、外側プローブでハイブリダイズした。 $\text{syno}^{+/+}$  および  $\text{syno}^{+/-}$  アレルでは、それぞれ 7.4-kb および 11.7-kb 断片を生じた。また、 $\text{syno}^{+/-}$  マウスの交配により生じた E13.0 胎仔から単離した染色体

10 DNA を PstI で消化し、上記と同じプローブでハイブリダイズした。図 1 (C) は、ノーザンブロット解析を示す写真である。 $\text{syno}^{+/-}$  を用いた交配により生じた E13.0 胎仔から単離した 20  $\mu\text{g}$  のトータル RNA を、シノビオリンプローブまたはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (G3PDH) プローブでハイブリダイゼーションした。図 1 (D) は、E13.0 胎仔から蛋白質を単離し、SES-PAGE で分離した (50  $\mu\text{g}$  蛋白質/レーン) 結果を示す写真である。蛋白質をメンブレンに

15 トランスファーした後、抗シノビオリン抗体と反応させた。

図 2 は、E13.5 ホモノックアウト（以下「 $\text{syno}^{-/-}$ 」と表示する）胎仔の表現型を示す写真である。図 2 (A) は、 $\text{syno}^{+/+}$ 、 $\text{syno}^{+/-}$  および  $\text{syno}^{-/-}$  E13.5 マウス胎仔の外観を示す。変異胎仔は  $\text{syno}^{+/+}$  と比較して同じ大きさであり、正常な発達を示す。図 2 (B) は、ヘマトキシリン・エオシンで染色した  $\text{syno}^{+/+}$ 、 $\text{syno}^{+/-}$  および  $\text{syno}^{-/-}$  E13.5 マウス胎仔の組織切片を示す写真である ( $\times 10$ )。

図 3 は、E13.5 胎仔より採取した肝臓の組織像を示す写真である。 $\text{syno}^{+/+}$ 、 $\text{syno}^{+/-}$  および  $\text{syno}^{-/-}$  E13.5 の肝臓切片の詳細を示す ( $\times 400$ )。 $\text{syno}^{-/-}$  胎仔における細胞密度が低いことが観察された。

25 図 4 は、 $\text{syno}^{-/-}$  胎仔由来肝臓細胞におけるアポトーシス細胞割合を解析した結果を示す写真である。(A)  $\text{syno}^{+/+}$  および  $\text{syno}^{-/-}$  胎児由来の肝臓組織の TUNEL

- 24 -

解析結果を示す(×200)。TUNEL 陽性率は *syno* <sup>+/+</sup>では1%であったのに対し、*syno* <sup>-/-</sup>では25%と高値を示した。このように肝臓で観察された違いは *syno* <sup>-/-</sup>全身にわたって観察された。(B) *syno* <sup>+/+</sup>およびホモノックアウト *syno* <sup>-/-</sup>胎仔におけるヘマトキシリン・エオシン染色結果を示す(×200)。

5 図5は、E10.5 *syno* <sup>-/-</sup>胎仔の造血を示す写真である。メイグリュンワルド・ギムザで染色した、E10.5 *syno* <sup>+/+</sup>、*syno* <sup>+/-</sup>および *syno* <sup>-/-</sup>胎仔から単離した末梢血のサイトスピン標本を示す。*syno* <sup>-/-</sup>胎仔は、赤芽球形成の減少およびアポトーシスの亢進を示した(矢印)。

図6は、E12.5 *syno* <sup>-/-</sup>胎仔の造血を示す写真である。上段は生存 E12.5 胎仔の末梢血のサイトスピン標本解析結果を示す。*syno* <sup>+/+</sup>胎仔と比較して、*syno* <sup>-/-</sup>胎仔では異常な赤芽球、核の断片化、およびハウエル・ジョリー小体が増加していた(矢印)。下段はメイグリュンワルド・ギムザで染色した E12.5 *syno* <sup>+/+</sup>および *syno* <sup>-/-</sup>胎仔の肝臓サイトスピン標本の解析結果を示す。*syno* <sup>-/-</sup>胎仔において、血球貪食が明らかに増加していた(矢印)。

15 図7は、12.5日齢の *syno* <sup>+/+</sup>およびホモノックアウト型 *syno* <sup>-/-</sup>胎仔由来の肝臓におけるβグロビンの発現を免疫組織染色(×200)により解析した結果を示す写真である。βグロビンの発現は *syno* <sup>-/-</sup>胎仔では、*syno* <sup>+/+</sup>に比して減少していることが示されている(*syno* <sup>+/+</sup>: 4.60%, *syno* <sup>-/-</sup>: 0.90%、矢印で示す)。

図8は、*syno* <sup>-/-</sup> MEFs は ER ストレスに対する感受性の増加を示す写真およびグラフである。図8(A)は、*syno* <sup>+/+</sup>および *syno* <sup>-/-</sup>マウス由来の MEFs を、低濃度の血清(1% FCS)培地中で、抗 Fas モノクローナル抗体(1 μg/ml で48時間)、X線照射(6 Gy で72時間)、タプシガルギン(1 μM で48時間)、およびツニカマイシン(10 ng/ml で48時間)を含む様々なアポトーシス刺激で処理するか、または未処理(-)のままにした結果を示す写真である。TUNEL 解析によりアポ  
25 トーシス細胞を検出した。図8(B)は、*syno* <sup>+/+</sup>および *syno* <sup>-/-</sup> MEFs を、示した用量の刺激で処理した結果を示すグラフである。細胞死検出 ELISA 法(Boehringer



- 25 -

Mannheim) を用いて DNA の断片化を定量することにより、アポトーシスを測定した。 $*P<0.01$ 。アポトーシス  $\text{syno}^{-/-}$  MEFs の数は、タプシガルギンおよびツニカマイシンで処理したものにおいて、それぞれの  $\text{syno}^{+/+}$  MEFs と比較して高かった。図 8 (C) は、LacZ (-) またはシノビオリン遺伝子 (+) を有するアデノウイルスベクター (100 moi) を  $\text{syno}^{+/+}$  および  $\text{syno}^{-/-}$  MEFs に感染させた後、前述と同じ薬剤で処理した結果を示すグラフである。 $\text{syno}^{-/-}$  MEFs において、ER ストレスに誘導されるアポトーシスはシノビオリンの発現によりレスキューされた。

図 9 は、シノビオリンは ERAD 系を介して抗アポトーシス蛋白質として作用することを示す図である。シノビオリンの「機能喪失」は、ERAD 系の破綻を介して全身性のアポトーシスをもたらす。この過程により、細胞密度の低下および造血の異常が生じ、ひいては胎仔が死亡する。一方、シノビオリンの「機能獲得」は、シノビオリンの抗アポトーシス効果を介して関節症の自然発症をもたらす。さらに、 $\text{syno}^{+/+}$  マウスは、関節炎に関連する実験で頻繁に用いられるモデルであるコラーゲン誘導関節炎 (CIA) に耐性である。まとめて考えると、シノビオリンは ERAD 系を介して「細胞機能の維持」において重要な役割を担う。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本願発明をより詳細に説明するが、本願発明はこれに限定されるものではない。

#### 20 [実施例 1] シノビオリン遺伝子のノックアウトマウスの作製

マウスシノビオリン遺伝子を破壊するため、ターゲティングベクターを構築した (図 1)。ベクター構築のため、C57BL/6 ゲノムライブラリーよりシノビオリン cDNA をクローニングした。遺伝子の翻訳開始コドンの位置に NcoI 部位を作出した後、遺伝子の NcoI/BanHI 断片を LacZ カセットで置換した (Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Sakakura, T., and Aizawa, S. 1992. Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev.* 6: 1821-1831.)。pMC1neo 由来のネオマイシンホスホ

- 26 -

ランスフェラーゼ (Neo) 遺伝子カセット (Strategene、カリフォルニア州、  
ラ・ホーヤ) を LacZ 遺伝子の下流に配置した。シノビオリン遺伝子の 1.85-kb  
の EcoRI/NcoI 断片および 8.5-kb の SalI/XhoI 断片を、これらのカセットのそれ  
ぞれ上流および下流に含めた。DT-A カセットでの負の選択は、以前に記載され  
5 ている (Yagi, T., Nada, S., Watanabe, N., Tamemoto, H., Kohmura, N., Ikawa, Y.,  
and Aizawa, S. 1993. A novel negative selection for homologous  
recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Anal. Biochem.* 214:  
77-86)。

C57BL/6 マウスと CBA マウスの F1 胎仔由来の TT2 ES 細胞を、以前に記載され  
10 ているようにフィーダー細胞上で培養した (Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y.,  
Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y., and  
Aizawa, S. 1993. A novel ES cell line, TT2, with high germline-  
differentiating potency. *Anal. Biochem.* 214: 70-76.)。この TT2 ES 細胞に  
上記ターゲティングベクターをエレクトロポレーションにより導入した。導入後、  
15 ベクターと内在のシノビオリン座位との間で相同的組換えが生じた場合、シノビ  
オリン座位には ATG 翻訳開始部位にインフレームの lacZ レポーター遺伝子およ  
びネオマイシン耐性遺伝子が挿入される。lacZ カセットはポリ (A) 付加配列を含  
むため、シノビオリン融合蛋白質の翻訳は妨げられると考えられる。

エレクトロポレーション後、薬剤 G418 で選択し、neo 耐性 TT2 ES クローン  
20 を単離した。単離されたクローンから染色体 DNA を回収し、制限酵素 BglII で消  
化した。この制限酵素消化産物を電気泳動で分離後、図 1A に示されたプローブ  
を用いてサザンブロット解析を行い、遺伝子型を同定した。上記相同組換え体は、  
サザンブロット解析により確認した (図 1B 左)。

2 つの独立した  $\text{syno}^{+/}$  ES クローンを ICR の 8 細胞期胚に注入した (Yagi, T.,  
25 Nada, S., Watanabe, N., Tamemoto, H., Kohmura, N., Ikawa, Y., and Aizawa, S.  
1993. A novel negative selection for homologous recombinants using

- 27 -

diphtheria toxin A fragment gene. *Anal. Biochem.* 214: 77-86.)。80%を超えるアグーチ色の毛色を有するキメラ雄を C57BL/6 または DBA1 雌と交配し、尾部由来および卵黄嚢 (yolk sac) 由来ゲノム DNA をサザンブロット解析または PCR 解析することにより、変異アレルのジャームライントランスミッションを同定した (図 1B 左)。遺伝子型同定には、以下のプライマーを用いた；

5' -ACACAGTCACCTCCGGTCTGTATTCACTG-3' (図 1A 中「P1」と示す領域)

5' -CTCAGTAACAGCGTACCAGGACCGTTCCAG -3'

これらのプライマーを用いて PCR を実施した。PCR は、96°C2 分間、96°C30 秒間、60°C30 秒間、72°C3 分間のサイクルを 35 サイクル、最終サイクルの後の 72°C10 分間の伸長反応、その後 4°Cで冷却という条件で行った。この PCR 解析により、変異および野生型アレルからそれぞれ 6.9 kb および 2.6 kb のフラグメントが生成される。

上記 2 つの独立した  $\text{syno}^{+/-}$  ES クローンを ICR-8 細胞期に注入した結果、ジェームライントランスミッションを起こした (図 1B 左)。変異に関してヘテロ接合性である  $\text{syno}^{+/-}$ F1 マウスは生存可能、繁殖可能であり、明らかな表現型の異常は認められなかった (データは示さず)。  $\text{syno}^{-/-}$  マウスを作出するために  $\text{syno}^{+/-}$  マウスを交配させ、新生子孫の遺伝子型を同定したが、  $\text{syno}^{-/-}$  マウスは同定されなかった。このことからシノビオリンの欠損は胎生致死をもたらす可能性が考えられた。そこで様々な発生段階での胎仔の解析を行ったところ、およそ 13.5 日齢までに致死となっていることが明らかとなった (表 1)。

- 28 -

表 1

ステージ	トータル (同腹仔群数)	シノビオリン			
		+/+	+/-	-/- ( 生 )	-/- ( 死 )
生後	10 (2)	2	8	0	
E18.5	3 (1)	3	0	0	
E17.5	4 (1)	0	4	0	
E15.5	5 (1)	1	4	0	
E14.5	50 (8)	22	22	0	6
E13.5	81(13)	27	47	2	5
E12.5	104(17)	26	67	10	1
E11.5	35 (5)	8	18	8	1
E10.5	26 (4)	8	12	6	0
トータル	318(51)	97	182	39	

このターゲティングされたシノビオリン変異体の性質を判定するため、いずれも 13 日齢の  $\text{syno}^{+/+}$  胎仔、 $\text{syno}^{+/-}$  胎仔および  $\text{syno}^{-/-}$  胎仔からゲノム DNA、トータル RNA および蛋白質を調製し、それぞれサザンブロッティング、ノーザンブロッティングおよびウェスタンブロッティングにより解析した。

なお、RNA 単離はチオシアン酸グアニンジンフェノールクロロホルム抽出法 (Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.) に基づく Isogen (Nippon Gene) を用いて実施し、E13.0 胎仔からトータル RNA を単離した。次に 20  $\mu\text{g}$  のトータル RNA をグリオキサールで変性させ、電気泳動により分離し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。クローニングしたシノビオリン cDNA フラグメントにおける 1235-3028 塩基に相当する DNA プローブでメンブレンをハイブリダイズした。

図 1B 右、C および D に示すように、 $\text{syno}^{-/-}$  胎仔ではシノビオリン遺伝子が欠

- 29 -

損し、またシノビオリン mRNA も蛋白質も検出されなかった。したがって、 $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔はシノビオリン転写産物も蛋白質も発現していないことが確認された。

[実施例 2]  $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔におけるアポトーシス細胞死

5      シノビオリン変異が致死となる胎仔発生の段階を同定するため、E10.5～E18.5 の胎仔を解析した。解析のため、子宮から胎仔を摘出した。遺伝子型同定のために卵黄嚢を回収した。次に胎仔の組織学的解析を行うために、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の 4%パラホルムアルデヒド中で胎仔を一晩固定してパラフィンに包埋し、4  $\mu\text{m}$  切片を切り出しヘマトキシリン・エオシンで染色し、何枚かの切片は  
10    TUNEL アッセイに使用した。サイトスピン標本のために、50% FCS および 10 mM EDTA を含む PBS 中に末梢血を回収した。E12.5 胎仔の胎仔肝を同じ培地 1 ml 中で 25 ゲージ針を用いて破壊し、約 7  $\mu\text{l}$  を 200  $\mu\text{l}$  の培地に希釈し、サイトスピ  
ンした。末梢血および胎仔肝のスライドをメイグリュンワルド・ギムザで染色した。

15    E11.5 では  $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔の大多数 (88.9%) が生存可能であったが、E13.5 ではごくわずかな  $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔しか生存していることが認められなかった (表 1)。E13.5 の胎仔を形態学的に解析したところ、 $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔、 $\text{syno}^{+/+}$ 胎仔および  $\text{syno}^{+/+}$ 同腹仔の間に外見上の顕著な変異は認められなかった (図 2A)。また、また組織学的な検討からも  $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔において、主要な臓器が欠失しているなど  
20    といった重篤な変異は認められなかった (図 2B)。

しかし、 $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔の肝臓組織像を狭画にて検討した結果、 $\text{syno}^{+/+}$ 胎仔や  $\text{syno}^{+/+}$ 胎仔に比べ  $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔では全身で細胞密度が低下していることが確認された (図 3)。我々は、細胞密度の低さは  $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔でのアポトーシス細胞死の亢進によるものと想定した。

25    シノビオリンの喪失によって誘導されるアポトーシス細胞死の程度を測定するため、各段階の胎仔で TUNEL 解析を実施した。詳細には、肝臓組織および切片は

- 30 -

上述の方法で調製した。これら標本を TUNEL 解析に供した。TUNEL 解析は製造業者(MEBSTAIN アポトーシスキット II、Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan).により提供されたプロトコールにしたがって実施した。異なる3領域における細胞 1000 個当たりの TUNEL 陽性細胞数をカウントし、TUNEL 陽性細胞割合を算出した。

E12.5 ではアポトーシス細胞死はとりわけ肝臓において顕著に検出された。またアポトーシス細胞の数は  $\text{syno}^{+/+}$  胎仔 (1%) と比較して  $\text{syno}^{-/-}$  胎仔 (25%) において有意に増加していた (図 4A)。この段階の胎仔では、シノビオリンは造血細胞を含めて偏在的に発現されている (データは示さず)。

#### [実施例 3] $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔の造血における異常なアポトーシス

マウス胎仔の正常な発生過程では、造血の主要器官は E11.5~E12.5 頃に卵黄囊から胎仔肝に移行する (Zon, L. I. 1995. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 86: 2876-2891.)。Null 突然変異マウスの様々な遺伝子の解析に基づくいくつかの研究から、造血機能障害はこの発生段階での致死と関連するケースが多いと結論づけられている (Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R., and Grosveld, F. 1995. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLf gene. *Nature* 375: 316-318. ; Okuda, T., vanDeursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G., and Downing, J. R. 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84: 321-330. ; Kieran, M. W., Perkins, A. C., Orkin, S. H., and Zon, L. I. 1996. Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 9126-9131. ; Wang, Q., Stacy, T., Miller, J. D., Lewis, A. F., Gu, T. L., Huang, X., Bushweller, J. H., Bories, J. C.,

- 31 -

Alt, F. W., Ryan, G., Liu, P. P., Wynshaw-Boris, A., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H., and Speck, N. A. 1996. The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell* 87: 697-708. ; Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, U., Dadgar, A. M., Johnson, R., and Karin, M. 2000. Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* 102: 221-231. ; Spyropoulos, D. D., Pharr, P. N., Lavenburg, K. R., Jackers, P., Papas, T. S., Ogawa, M., and Watson, D. K. 2000. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Flil transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 20: 5643-5652. ; Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. 2001. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 292: 1546-1549.). そこで、syno<sup>-/-</sup>胎仔における造血の状態を検討するため、E10.5、E12.5 の末梢血および E12.5 の胎仔肝のサイトスピン標本を調べた。

まず、一次造血の状態を解析するために、E10.5 から得られた末梢血試料を染色し、syno<sup>+/+</sup>および syno<sup>+/-</sup>の同腹仔の赤芽球形成 ( $3.0 \pm 0.66 \times 10^6$  細胞) を比較した (図 5)。syno<sup>-/-</sup>胎仔では、syno<sup>+/+</sup>および syno<sup>+/-</sup>胎仔と比較して、その減少 ( $8.3 \pm 0.46 \times 10^5$  細胞) が示された。さらに、syno<sup>+/+</sup>赤芽球ではアポトーシスは観察されなかったのに対して、syno<sup>-/-</sup>赤血球ではアポトーシスが認められた (図示せず)。

次に、二次造血が行われている 12.5 日齢の末梢血のギムザ染色を行った。ここでは先程の一次造血によって形成された赤芽球よりもさらに分化の段階が進んだ赤芽球が観察され、また脱核が起こった成熟赤血球も認められる。E12.5 の末梢血試料の染色では、syno<sup>+/+</sup> ( $4.0 \pm 0.18 \times 10^5$  細胞) と比較して syno<sup>-/-</sup>胎仔では赤芽球数の減少 ( $18.0 \pm 0.19 \times 10^5$  細胞) が示された (図 6)。さらに、syno<sup>-/-</sup>胎

- 32 -

仔では、ハウエル・ジョリー小体、核の断片化を起こしている赤芽球、二分葉の核を持つ赤芽球等の異常な赤芽球の比率が、 $\text{syno}^{+/+}$ 同腹仔では 1.8%であるのに対して 10.5%と顕著に高かった（表 2、異常な赤芽球を図 6 上段矢印で示す）。

5

表 2

赤芽球形態	+/+	+/-	-/-
核崩壊	0.0%	0.6%	2.0%
二核	0.1%	1.2%	2.1%
ホエル-ジョリー小体	1.7%	3.8%	6.4%

上記観察において、 $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔で一次造血の際に認められた赤芽球でのアポトーシスは、E12.5 の時点ではほとんど認められなかった。この理由を検討するために肝臓のギムザ染色を行った。ギムザ染色の結果（図 6 下段）、マクロファージによる赤芽球の貪食、すなわち hemophagocytosis の像（図 6 下段矢印で示す）は、 $\text{syno}^{+/+}$ や  $\text{syno}^{+/-}$ ではほとんど見られないのに対し、 $\text{syno}^{-/-}$ では 100 マクロファージ細胞中 22 個と有意に増加していることが確認された（表 3）。このことから、10.5 日齢で見られたようなアポトーシスを起こした赤芽球は造血の場である肝臓においてマクロファージにより貪食・排除され、その結果、E12.5 由来の末梢血ではアポトーシスを起こした赤芽球が認められないということが予測される。

10

15

表 3

Mφ 貪食像	+/+	+/-	-/-
（個 / 100 Mφ）	1	7	22

20

この現象は、 $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔肝の組織学的切片においても認められた（図 3）。これらの結果から、マクロファージが活性化され、異常な赤芽球を貪食したことが



- 33 -

示唆された。総合して考えると、これらの知見から、シノビオリンの欠如はアポトーシスの亢進に起因する異常な赤血球分化に関連することが示唆され、 $\text{syno}^{-/-}$ 胎仔は循環する赤芽球数が減少した結果として貧血で死ぬと考えられる。

さらに本願発明者らは、シノビオリンの造血への関与を研究するために、二次造血のマーカーである  $\beta$ -グロビンの発現を免疫組織染色法により検討した。

免疫組織染色は以前に報告されている通りの手法で実施した(Kawahara et al., 1999)。切片は抗  $\beta$ -グロビン抗体で一晩インキュベートした。抗原-抗体の特異的な反応はジアミノベンジン基質クロモジェンシステム (diaminobenzidine substrate chromogen system、Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用い、添付のマニュアルに従って実施した。異なる 3 つの領域中の細胞を 1000 個数え、陽性細胞率を計算した。

その結果、 $\beta$ -グロビンの発現が  $\text{syno}^{-/-}$ では  $\text{syno}^{+/+}$ マウスに比べ顕著に減少していることが明らかとなった (図 7)。この結果は造血、とりわけ二次造血においてシノビオリンが重要な役割を果たしていることを示している。

[実施例 4]  $\text{syno}^{-/-}$ マウス胎仔線維芽細胞は、ER ストレスに選択的に影響を受けやすい

アポトーシスは、いくつかの経路を介して誘導され得る。シノビオリンの関与を説明するアポトーシス経路を同定するため、 $\text{syno}^{-/-}$ および  $\text{syno}^{+/+}$ 胎仔から MEFs を単離した。MEFs は、10.5 日齢の  $\text{syno}^{-/-}$ および  $\text{syno}^{+/+}$ 胎仔の頭部および臓器を除去した後、これらの胎仔をトリプシン消化することにより単離した。単離した細胞を、20%ウシ胎仔血清 (FCS) を含むダルベッコ変法イーグル培地で培養した。この MEFs に対して以下の 4 つのアポトーシス刺激をインビトロで加えた；モノクローナル抗 Fas 抗体 (Ab)， $\gamma$  照射、ツニカマイシン (N-グリコシル化阻害剤)、およびタプシガルギン ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 阻害剤)。

対照条件下では、 $\text{syno}^{-/-}$  MEFs アポトーシス細胞の比率は  $\text{syno}^{+/+}$  MEFs (6 ±

- 3 4 -

2%) よりも高かった ( $16 \pm 4\%$ 、図 8 A)。Fas 刺激または  $\gamma$  照射では、アポトーシス  $\text{syno}^{-/-}$  MEFs および  $\text{syno}^{+/+}$  MEFs の数は変化しなかった (Fas :  $\text{syno}^{-/-}$ 、 $45 \pm 2\%$ 、 $\text{syno}^{+/+}$ 、 $43 \pm 4\%$  ;  $\gamma$  照射 :  $\text{syno}^{-/-}$   $34 \pm 6\%$ 、 $\text{syno}^{+/+}$   $31 \pm 2\%$ 、図 8 A)。一方、ER ストレス誘導剤であるツニカマイシンおよびタプシガルギンでは、TUNEL 陽性

5  $\text{syno}^{-/-}$  MEFs の数が  $\text{syno}^{+/+}$  MEFs と比較してそれぞれ 1.7 倍および 2.4 倍に増加した ( $33 \pm 7\%$  に対して  $56 \pm 3\%$  ;  $38 \pm 7\%$  に対して  $90 \pm 1\%$ 、図 8 A)。さらに、ER ストレス誘導剤に対する感受性は、用量依存的な様式で増加した (図 8 B)。

上記  $\text{syno}^{-/-}$  MEFs に与えられたアポトーシス刺激による影響が外来からシノビオリン遺伝子を導入することにより低減または消失するかを検討した。Adeno-X

10 (商標) 発現系により、製造業者の説明に従い (Clontech Laboratories Inc. カリフォルニア州、パロアルト)、Flag タグ化シノビオリンまたは LacZ の遺伝子を含むアデノウイルスベクターを調製した。HEK293 細胞で end-point dilution アッセイを行うことにより、ウイルス調製物の力価を測定した。細胞当たりのウイルス粒子数 (プラーク形成単位 : PFU で測定される) を、moi として

15 表した。感染 MEFs に標的遺伝子を 48 時間発現させた後、表示の試薬で処理した。

$\text{syno}^{-/-}$  MEFs において、Fas を介したアポトーシスおよび  $\gamma$  照射によって誘導されたアポトーシスは、アデノウイルスを用いたシノビオリンの発現によりレスキューされなかったのに対し、ER ストレスによって誘導されたアポトーシスは

20 レスキューされた (図 8 C)。総合して考えると、これらの結果から、シノビオリンは ER ストレスにより誘導されるアポトーシスから MEFs をレスキューするが、Fas または  $\gamma$  照射により誘導されるアポトーシスからは救出されないことが示唆される。さらに、CHOP/Gadd153、ATF-6、カスパーゼ-12 等の ER ストレス誘導性蛋白質の発現をウェスタンブロッティングにより解析したが、 $\text{syno}^{-/-}$  MEFs にお

25 いてこれらの蛋白質は誘導されていることが認められた (データは示さず)。

上記  $\text{syno}^{-/-}$  MEFs において、データには示さないが CHOP/Gadd153 および ATF-

- 35 -

6 を含む ER ストレス誘導性蛋白質の発現が誘導された。これらの蛋白質は、ER  
ストレスに対抗する UPR に関与すると考えられている。したがって、*syno*<sup>-/-</sup>  
MEFs では、アポトーシスは、ER ストレスに応答した UPR 系を介してではなく、  
ERAD 系の破綻によって誘導されるように思われる。すなわち、ERAD 系は蛋白質  
5 の品質管理に主に関与しているようであり、それは同時に特に胎仔形成過程にお  
ける「生命の維持」に不可欠である。CHIP、gp78/AMFR、パーキン、および  
Fbx2/FBG1/NFB42 等のいくつかのユビキチンリガーゼ (E3) が、ERAD 系に関与す  
ることが報告されている。しかし、シノビオリンの「機能喪失」は、代替機能が  
ないことから、胎仔形成過程において致死となるのであろう。我々の研究は、他  
10 のユビキチンリガーゼ (E3) の中でも特にシノビオリンが、ERAD 系において極  
めて重要な役割を果たすことを明らかに示唆するものである。

#### 産業上の利用の可能性

ERAD 系のユビキチンリガーゼ (E3) の中で中心的役割を担うと考えられてい  
15 る酵母 Hrd1p/Del3 (Bays, N. W., Gardner, R. G., Seelig, L. P., Joazeiro, C. A.,  
and Hampton, R. Y. 2001. Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin  
ligase required for ER-associated degradation. *Nat. Cell Biol.* 3: 24-  
29.) のヒト相同体であるシノビオリンの機能を解析するため、本研究において  
我々は、インビボでの ERAD 系の機能を明らかにする手段として ES 細胞を用いて  
20 シノビオリンを欠損したマウスを作製した。

上記において詳述した通り、*syno*<sup>-/-</sup>マウスは E12.5~E13.5 までに子宮内で死  
亡した。*syno*<sup>-/-</sup>胎仔では、過度のアポトーシスによりいくつかの器官で明らかに  
低い細胞密度を示し、造血系においてもアポトーシスの異常が認められた。この  
ことから、*syno*<sup>-/-</sup>胎仔は造血系疾患、とりわけ、ER ストレス誘導性アポトーシ  
25 スが起因した赤芽球の分化異常に関わる疾患の研究あるいは治療剤開発のための  
モデルとして利用し得る。このように 13.5 日齢付近で胎生致死となる KO マウス

- 36 -

は他にも報告されているが（表4）、本願発明のモデルはこれら報告されているものとは別個の遺伝子であるシノビオリンがノックアウトされている。したがって、本発明のモデルは、エリスロポエチン（EPO）などを欠損したモデルでは解析できない造血系疾患のモデルとして、さらには造血系疾患治療薬の探索に役立つことが期待される。

表 4

遺伝子	ステージ	表現型
AML1	E12.5	胎仔肝での二次造血異常
アンギオポイエチン-1	E12.5	心血管系の異常
bcl-x	E13.0	末梢神経節での細胞死、胎仔肝での未成熟造血細胞の細胞死増加
cas	E11.5～12.5	心臓の低形成、血管平滑筋の収縮機能不全による鬱血
EKLF	E13.0まで	極度の貧血
EPO	E13.0	胎仔肝での二次造血異常
EPOR	E13.0	胎仔肝での二次造血異常
c-jun	E11.5～15.5	胎仔肝での有核赤血球の増加
ケラチン8	E12.0～E15.5	胎仔肝での有核赤血球の増加
c-myb	E15.5	胎仔肝での二次造血異常
RB	E12.0～16.0	中枢神経系、造血系の異常
sox4	E14.0	心臓の形成異常
Tie-1	E13.5～14.5	血管細胞の保持に異常
VCAM-1	E11.5～12.5	胎盤、心臓の形成異常

ノックアウトマウスデータブックより抜粋

本願発明者らはまた、syno<sup>-/-</sup>胎仔における造血系細胞の低下を裏付けた実験として syno<sup>-/-</sup>胎仔由来の MEFs を用いた実験を示した。ここではインビトロで ER ストレスに対して高く選択的な感受性を示し、syno<sup>-/-</sup>胎仔におけるアポトーシス細胞死は ER ストレスによって誘導され得ると考えられる。この実験より、syno<sup>-/-</sup>胎仔由来の MEFs が、ER ストレス誘導性アポトーシスを研究するためのモデル細胞となること、さらには、このアポトーシスを回避または抑制するための薬剤のスクリーニング用の細胞として利用し得ることを示している。

また、本発明のシノビオリン等を有効成分とする造血系疾患の医薬製剤は、遺伝的な要因でまたは後発的な環境的要因からシノビオリンの機能低下または発現

- 37 -

低下が起因して造血系疾患を発症している患者の治療剤として有効になると期待される。

- 38 -

## 請求の範囲

1. 以下の (a) - (d) からなる群から選択されるいずれかの蛋白質またはそれをコードするポリヌクレオチドを投与する工程を含む、造血系疾患の治療方法。

(a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(c) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされ、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：1 に記載の塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

2. 造血系疾患が、赤芽球の分化異常に起因する疾患である請求項1 に記載の方法。

3. 前記ポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクターを、造血幹細胞に導入する工程を含む、請求項1 に記載の方法。

4. 造血幹細胞において、以下の (a) - (d) からなる群から選択されるいずれかの蛋白質を発現させる工程を含む、赤芽球を分化させるための方法。

(a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、

- 39 -

配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(c) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリン  
ジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコ  
ードされ、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：1に記載の塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有  
する塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、配列番  
号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

5 10 5. 以下の(a) - (d)からなる群から選択されるいずれかの蛋白質またはそ  
れをコードするポリヌクレオチドを有効成分として含有する、造血系疾患の  
治療用医薬製剤。

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、

15 (b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ  
酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、  
配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な  
蛋白質

20 (c) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリン  
ジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコ  
ードされ、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

(d) 配列番号：1に記載の塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有  
する塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされ、配列番  
号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質

25 6. 前記ポリヌクレオチドを発現可能に保持した造血幹細胞である、請求項5に  
記載の医薬製剤。

- 40 -

7. 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の活性増強剤を投与する工程を含む、造血系疾患の治療方法。
8. 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の活性増強剤を有効成分として含有する、造血系疾患の治療剤。
- 5 9. シノビオリン遺伝子機能が欠損している、造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔。
- 10 10. 非ヒト動物がげっ歯目動物である、請求項9記載の造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔。
11. げっ歯目動物がマウスである、請求項10記載の造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔。
12. 13.5 日齢以前の胎仔である、請求項11記載の造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔。
13. 造血系疾患が赤芽球の分化異常に起因する疾患である、請求項9記載の造血系疾患モデル非ヒト動物。
14. 請求項9から13のいずれかに記載の造血系疾患モデル動物胎仔由来の造血系疾患モデル細胞。
- 15 15. 線維芽細胞である、請求項14記載の造血系疾患モデル細胞。
16. シノビオリン遺伝子機能が欠損している造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔に被験物質を投与し、該非ヒト動物胎仔における赤芽球の状態を評価する、造血系疾患の治療剤のスクリーニング方法。
- 20 17. 以下（a）から（c）の工程を含む、造血系疾患の治療剤のスクリーニング方法。
- （a）シノビオリン遺伝子機能が欠損している造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔または当該胎仔由来細胞に ER ストレス誘導剤を投与または接触させる工程、
- 25 （b）上記（a）工程の前後又は同時に前記シノビオリン遺伝子機能が欠損している造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔または前記胎仔由来細胞



- 41 -

胞に被験物質を投与または接触させる工程、

(c) 前記非ヒト動物胎仔または胎仔由来細胞におけるアポトーシスが誘導された細胞を測定する工程

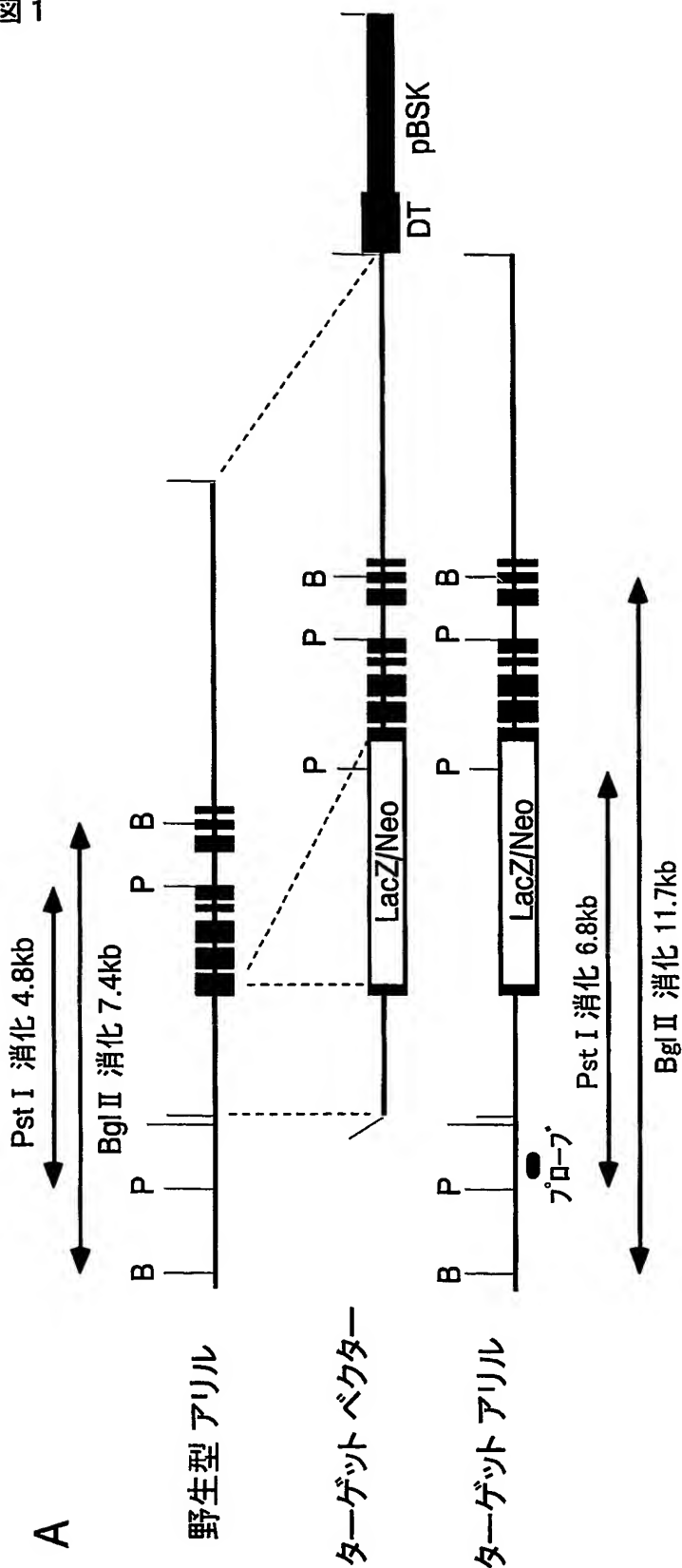
18. 以下 (a) から (c) の工程を含む、ER ストレス除去剤のスクリーニング方法。

(a) 内在シノビオリン遺伝子機能が欠損している細胞に ER ストレス誘導剤を作用させる工程、

(b) 上記 (a) 工程の前後又は同時に前記細胞に被験物質を接触させる工程、

10 (c) 前記細胞におけるアポトーシスが誘導された細胞を測定する工程

図 1



**B** サザンブロット **C** ノーザンブロット **D** ウェスタンブロット

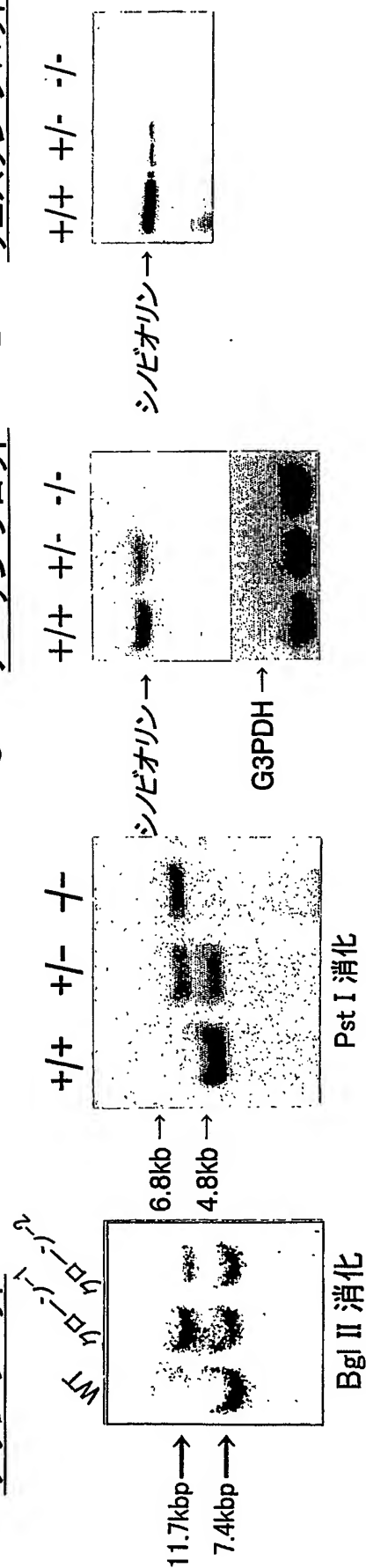


図 2

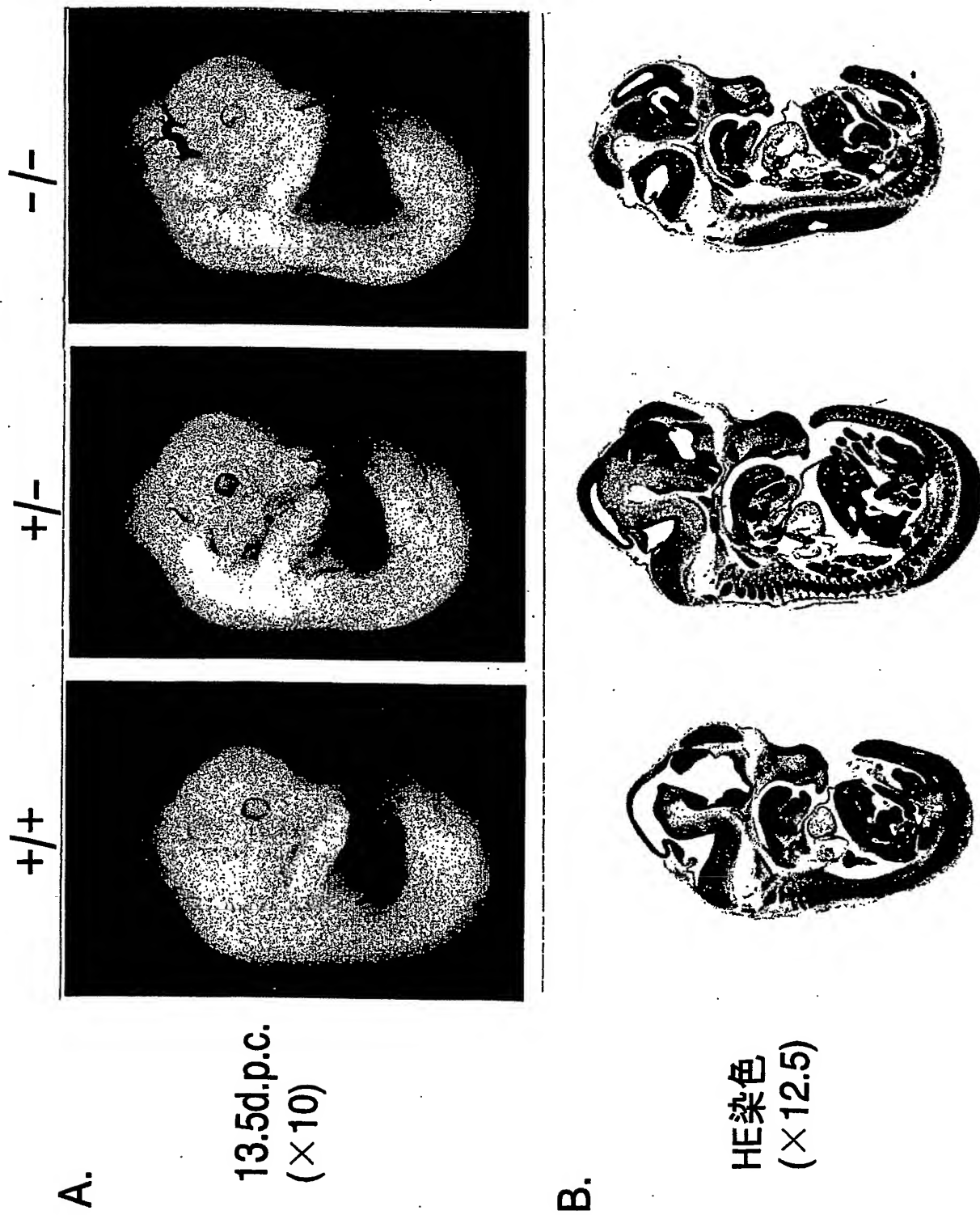
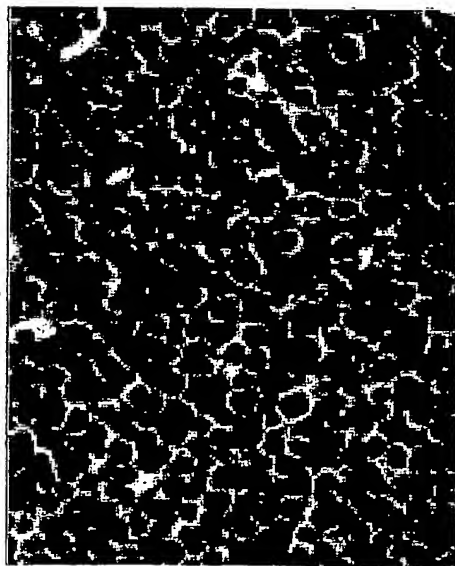


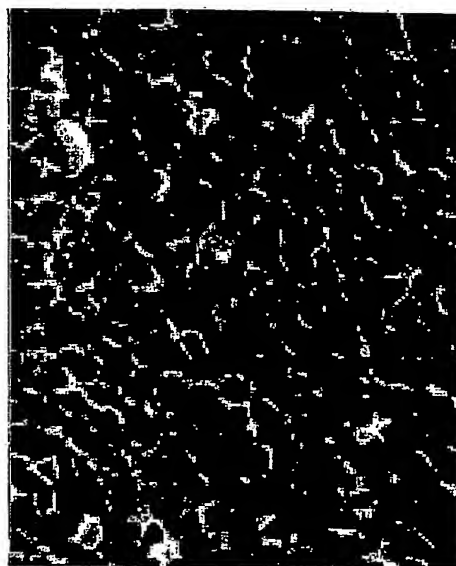
図 3

肝臓 (×400)

+/+



+/+



-/-

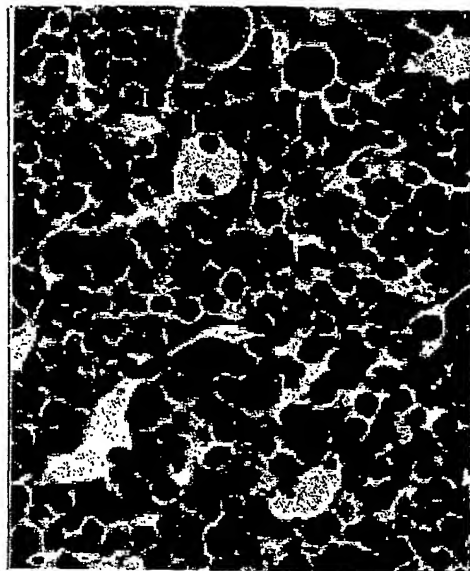


図 4

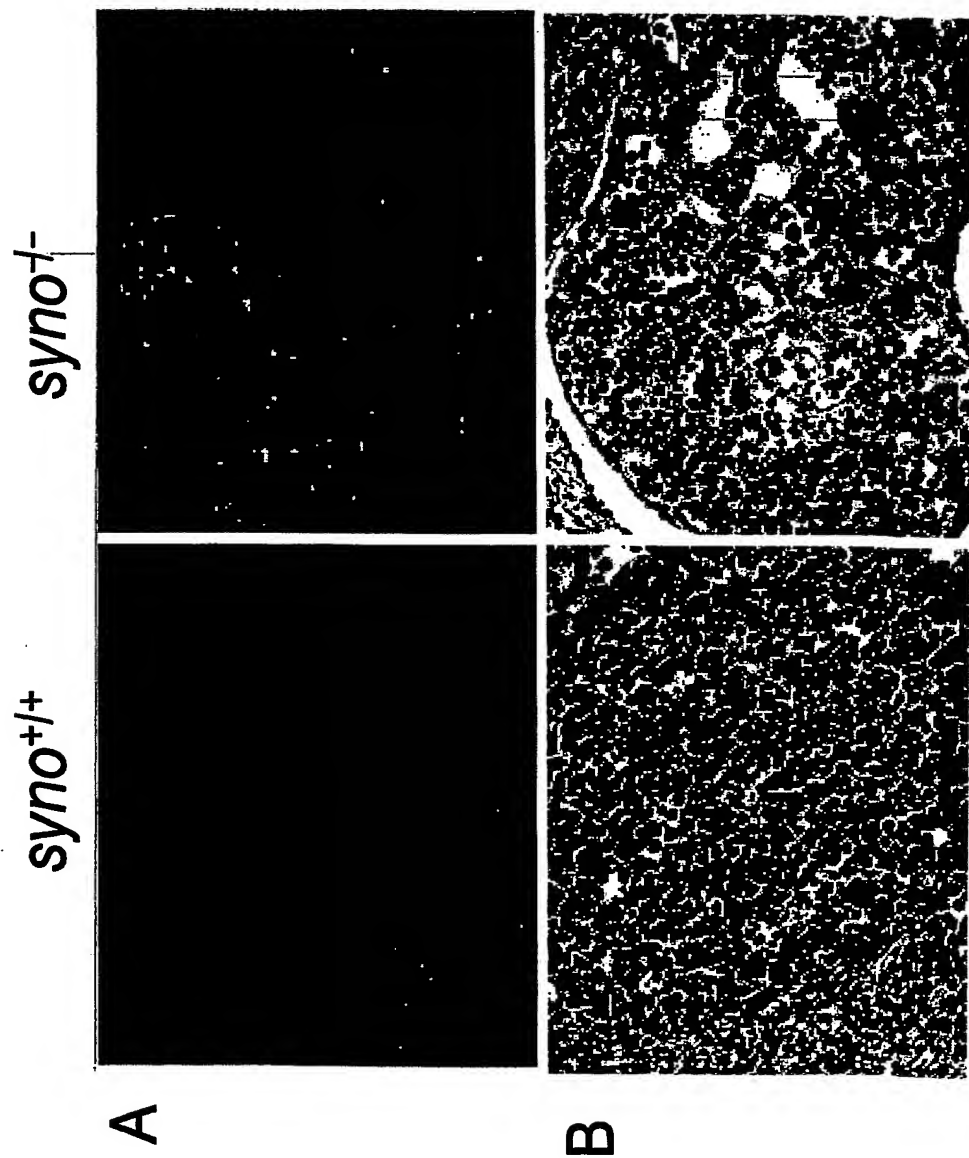


図 5

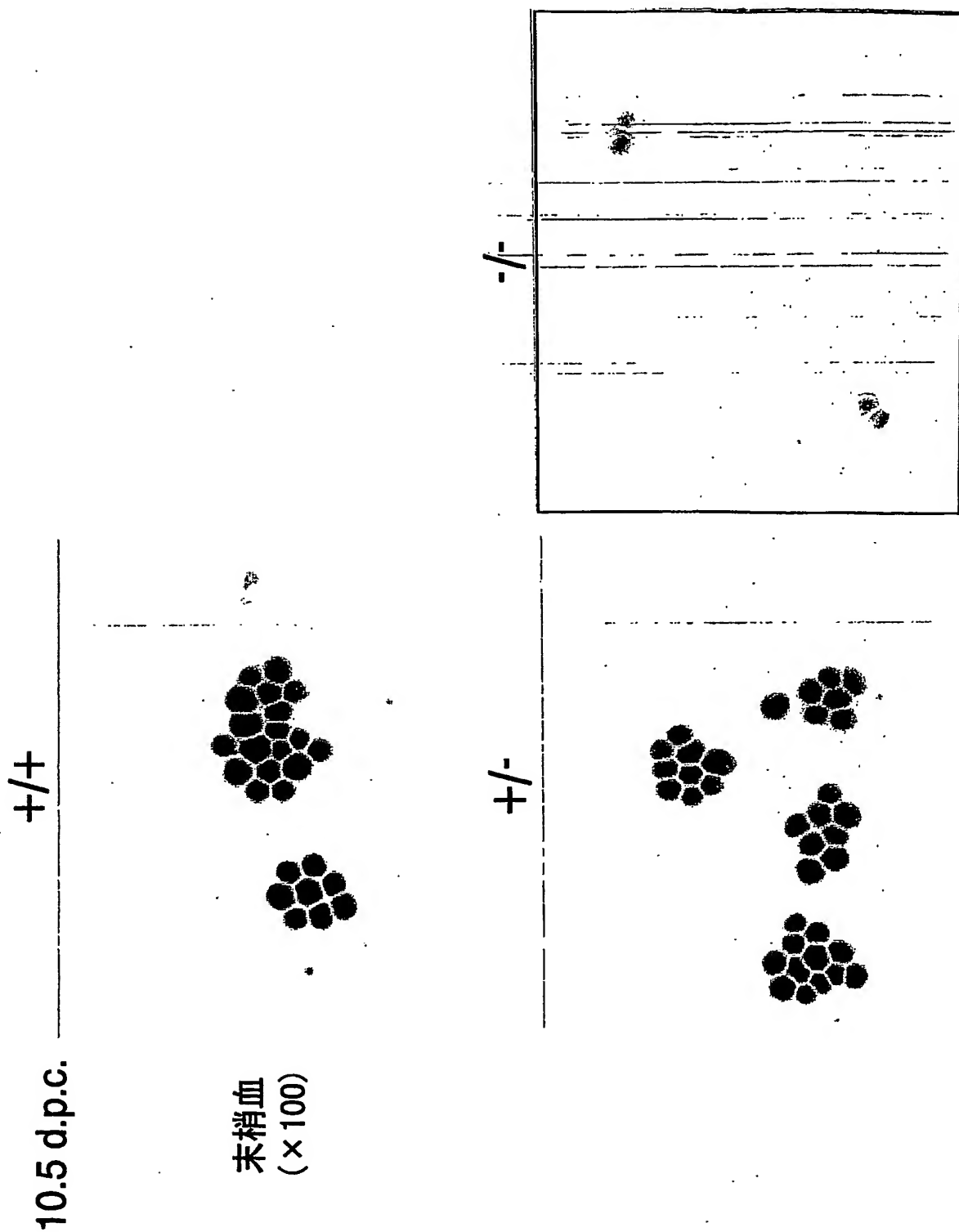


図 6

12.5 d.p.c.

末梢血 (×400)

肝臓 (×400)

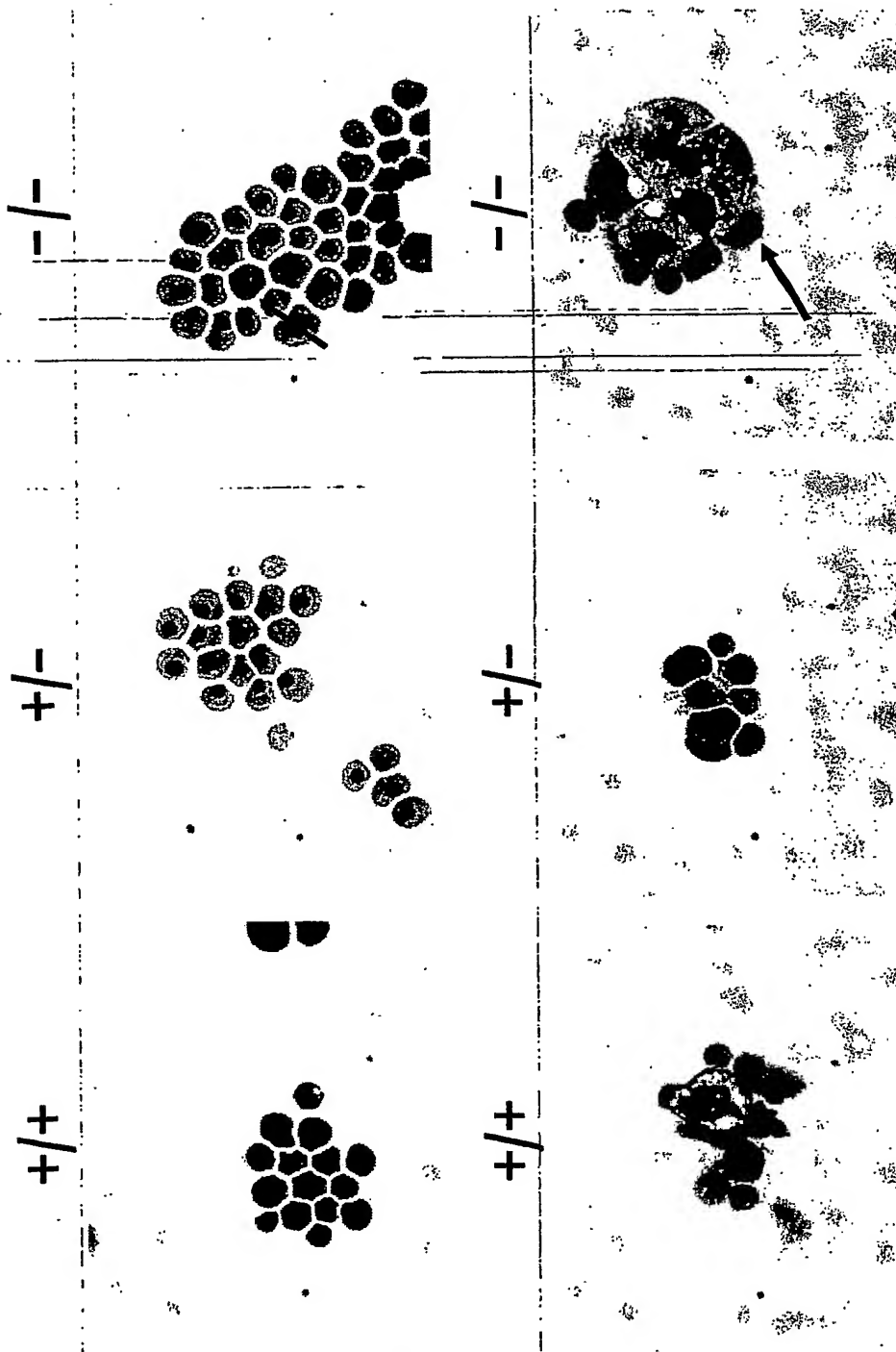


図 7





図 8

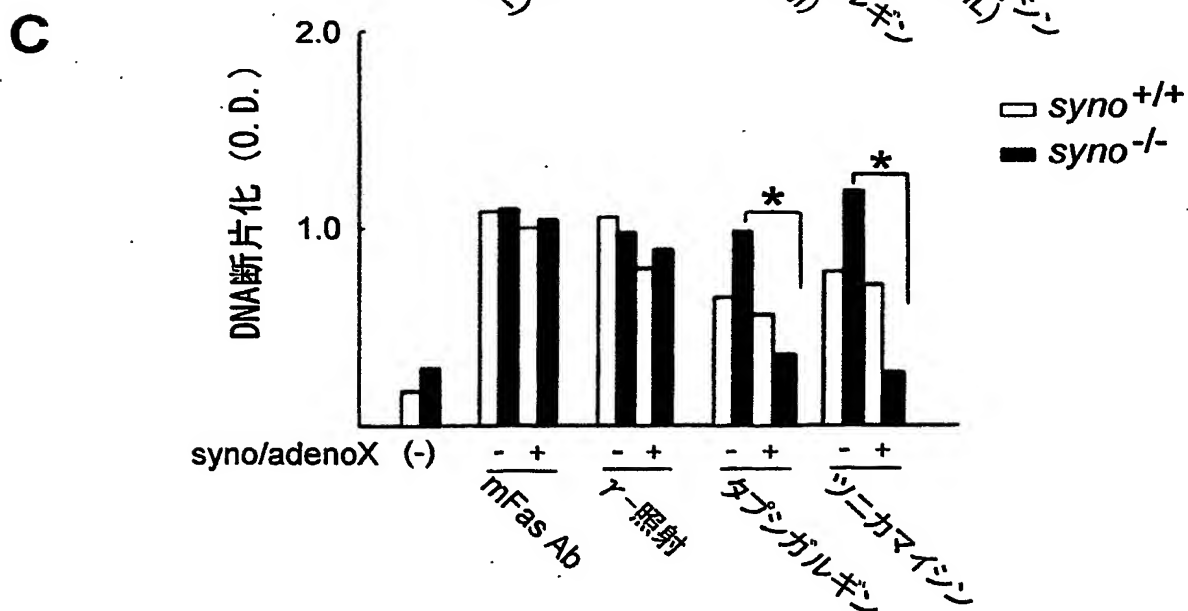
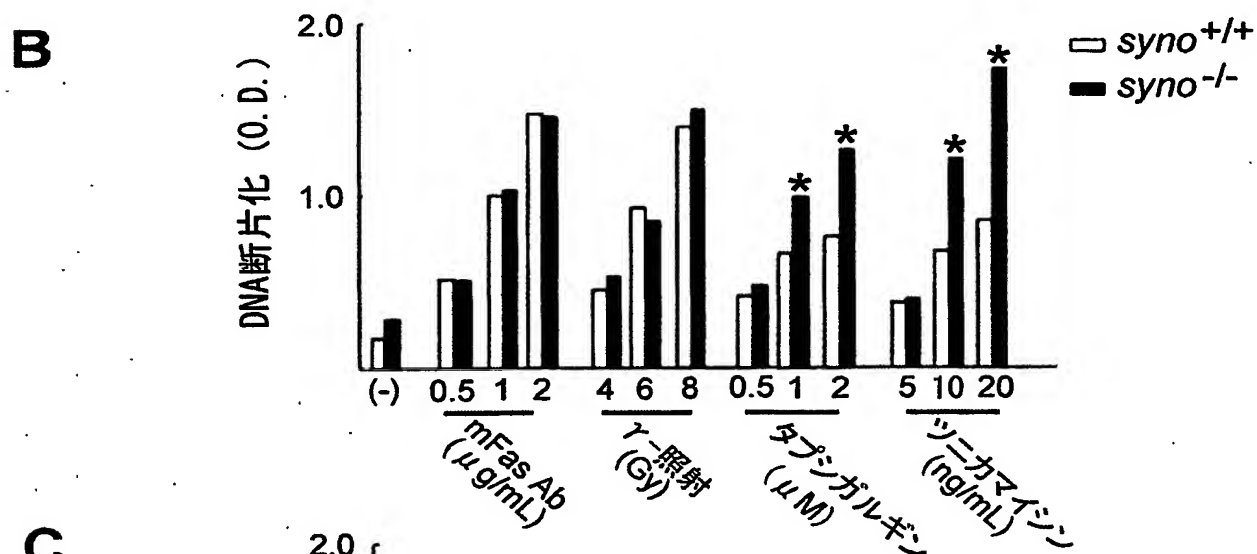
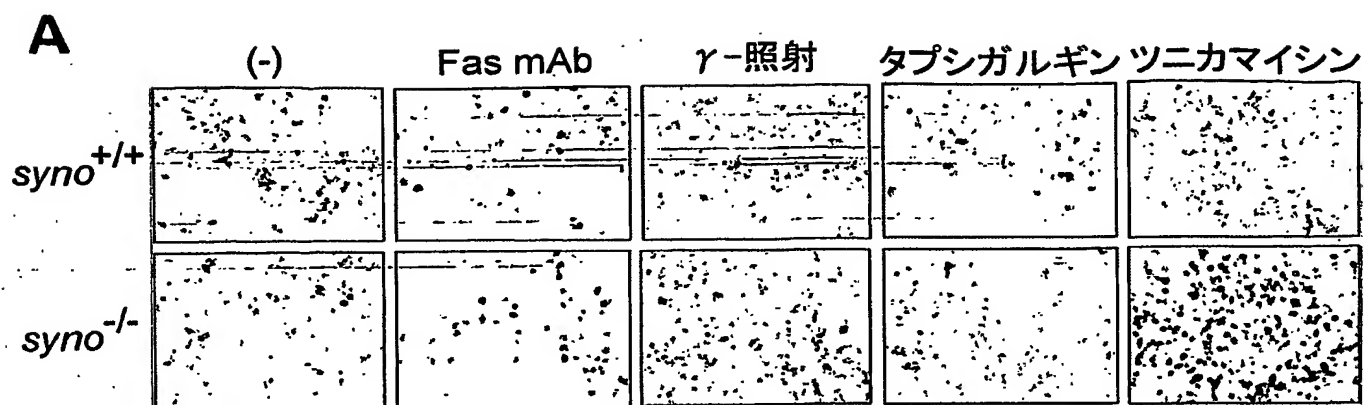
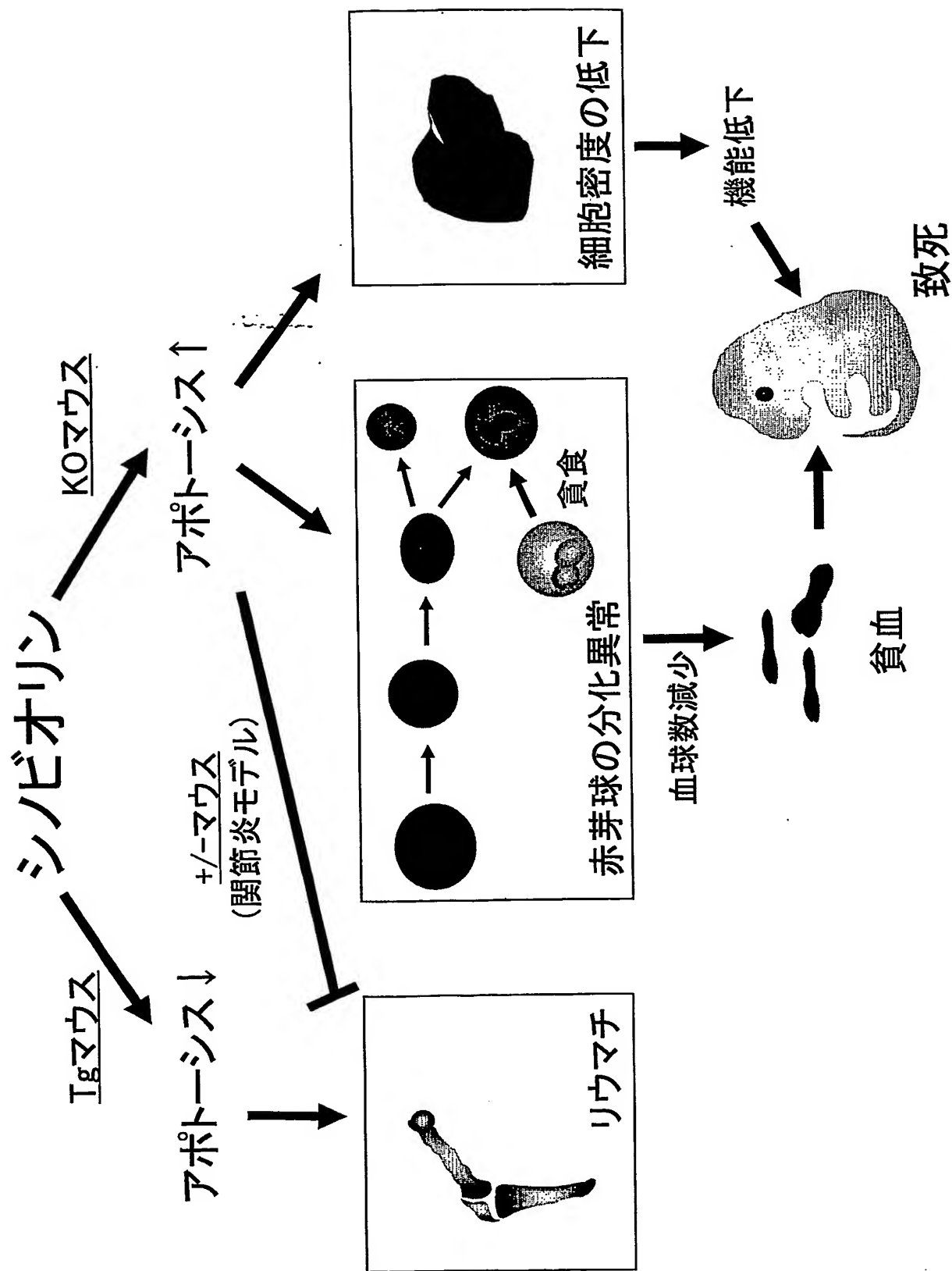


図 9



1 / 27

SEQUENCE LISTING

<110> LOCOMOGENE, INC.

<120> Drugs for treatment of Hematopoietic diseases

<130> BHP-A0301P

<140>

<141>

<150> US 60/495,001

<151> 2003-08-13

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (403)..(2256)

2 / 27

&lt;400&gt; 1

gccctttctt atgagcatgc ctgtgttggg ttgacagtga gggtaataat gacttgttgg 60

ttgattgtag atatagggtc ctcccttgca aggtaattag gctccttaaa ttacctgtaa 120

gattttcttg ccacagcatc cattctgggtt aggtgtgtga tcttctgagt agtgatagat 180

tggttggtgg tgaggtttac aggtgttccc ttctcttact cctggtgttg gctacaatca 240

ggtggcgtct agagcagcat gggacaggtg ggtaagggga gtcttctcat tatgcagaag 300

tgatcaactt aaatctctgt cagatctacc tttatgtagc ccggcagtcg cgcggattga 360

gcgggctcgc ggcgctgggt tcttggcttc cgggccaggg ca atg ttc cgc acg 414

Met Phe Arg Thr

1

gca gtg atg atg gcg gcc agc ctg gcg ctg acc ggg gct gtg gtg gct 462

Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ala Val Val Ala

5

10

15

20

cac gcc tac tac ctc aaa cac cag ttc tac ccc act gtg gtg tac ctg 510

His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr Val Val Tyr Leu

25

30

35

3 / 27

acc aag tcc agc ccc agc atg gca gtc ctg tac atc cag gcc ttt gtc 558

Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile Gln Ala Phe Val

40

45

50

ctt gtc ttc ctt ctg ggc aag gtg atg ggc aag gtg ttc ttt ggg caa 606

Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val Phe Phe Gly Gln

55

60

65

ctg agg gca gca gag atg gag cac ctt ctg gaa cgt tcc tgg tac gcc 654

Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg Ser Trp Tyr Ala

70

75

80

gtc aca gag act tgt ctg gcc ttc acc gtt ttt cgg gat gac ttc agc 702

Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg Asp Asp Phe Ser

85

90

95

100

ccc cgc ttt gtt gca ctc ttc act ctt ctt ctc ttc ctc aaa tgt ttc 750

Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe Leu Lys Cys Phe

105

110

115

cac tgg ctg gct gag gac cgt gtg gac ttt atg gaa cgc agc ccc aac 798

His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu Arg Ser Pro Asn

120

125

130

atc tcc tgg ctc ttt cac tgc cgc att gtc tct ctt atg ttc ctc ctg 846

Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu Met Phe Leu Leu

4 / 27

135	140	145	
ggc atc ctg gac ttc ctc ttc gtc agc cac gcc tat cac agc atc ctg 894			
Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr His Ser Ile Leu			
150	155	160	
acc cgt ggg gcc tct gtg cag ctg gtg ttt ggc ttt gag tat gcc atc 942			
Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe Glu Tyr Ala Ile			
165	170	175	180
ctg atg acg atg gtg ctc acc atc ttc atc aag tat gtg ctg cac tcc 990			
Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr Val Leu His Ser			
	185	190	195
gtg gac ctc cag agt gag aac ccc tgg gac aac aag gct gtg tac atg 1038			
Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys Ala Val Tyr Met			
200	205	210	
ctc tac aca gag ctg ttt aca ggc ttc atc aag gtt ctg ctg tac atg 1086			
Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val Leu Leu Tyr Met			
215	220	225	
gcc ttc atg acc atc atg atc aag gtg cac acc ttc cca ctc ttt gcc 1134			
Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe Pro Leu Phe Ala			
230	235	240	

5 / 27

atc cgg ccc atg tac ctg gcc atg aga cag ttc aag aaa gct gtg aca 1182  
Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys Lys Ala Val Thr  
245 250 255 260

gat gcc atc atg tct cgc cga gcc atc cgc aac atg aac acc ctg tat 1230  
Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met Asn Thr Leu Tyr  
265 270 275

cca gat gcc acc cca gag gag ctc cag gca atg gac aat gtc tgc atc 1278  
Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp Asn Val Cys Ile  
280 285 290

atc tgc cga gaa gag atg gtg act ggt gcc aag aga ctg ccc tgc aac 1326  
Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg Leu Pro Cys Asn  
295 300 305

cac att ttc cat acc agc tgc ctg cgc tcc tgg ttc cag cgg cag cag 1374  
His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe Gln Arg Gln Gln  
310 315 320

acc tgc ccc acc tgc cgt atg gat gtc ctt cgt gca tcg ctg cca gcg 1422  
Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu Pro Ala  
325 330 335 340

cag tca cca cca ccc ccg gag cct gcg gat cag ggg cca ccc cct gcc 1470  
Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly Pro Pro Pro Ala

6 / 27

345	350	355	
ccc cac ccc cca cca ctc ttg cct cag ccc ccc aac ttc ccc cag ggc 1518			
Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn Phe Pro Gln Gly			
360	365	370	
ctc ctg cct cct ttt cct cca ggc atg ttc cca ctg tgg ccc ccc atg 1566			
Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu Trp Pro Pro Met			
375	380	385	
ggc ccc ttt cca cct gtc ccg cct ccc ccc agc tca gga gag gct gtg 1614			
Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Gly Glu Ala Val			
390	395	400	
gct cct cca tcc acc agt gca gca gcc ctt tct cgg ccc agt gga gca 1662			
Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Ser Gly Ala			
405	410	415	420
gct aca acc aca gct gct ggc acc agt gct act gct gct tct gcc aca 1710			
Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ala Thr			
425	430	435	
gca tct ggc cca ggc tct ggc tct gcc cca gag gct ggc cct gcc cct 1758			
Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly Pro Ala Pro			
440	445	450	



7 / 27

ggt ttc ccc ttc cct cct ccc tgg atg ggt atg ccc ctg cct cca ccc 1806

Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu Pro Pro Pro

455

460

465

ttt gcc ttc ccc cca atg cct gtg ccc cct gcg ggc ttt gct ggg ctg 1854

Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe Ala Gly Leu

470

475

480

acc cca gag gag cta cga gct ctg gag ggc cat gag cgg cag cac ctg 1902

Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg Gln His Leu

485

490

495

500

gag gcc cgg ctg cag agc ctg cgt aac atc cac aca ctg ctg gac gcc 1950

Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu Leu Asp Ala

505

510

515

gcc atg ctg cag atc aac cag tac ctc acc gtg ctg gcc tcc ttg ggg 1998

Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala Ser Leu Gly

520

525

530

ccc ccc cgg cct gcc act tca gtc aac tcc act gag ggg act gcc act 2046

Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly Thr Ala Thr

535

540

545

aca gtt gtt gct gct gcc tcc tcc acc agc atc cct agc tca gag gcc 2094

Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser Ser Glu Ala

8 / 2 7

550	555	560	
acg acc cca acc cca gga gcc tcc cca cca gcc cct gaa atg gaa agg	2142		
Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu Met Glu Arg			
565	570	575	580
cct cca gct cct gag tca gtg ggc aca gag gag atg cct gag gat gga	2190		
Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro Glu Asp Gly			
585	590	595	
gag ccc gat gca gca gag ctc cgc cgg cgc cgc ctg cag aag ctg gag	2238		
Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln Lys Leu Glu			
600	605	610	
tct cct gtt gcc cac tga cactgccccca gccagcccc agcctctgct	2286		
Ser Pro Val Ala His			
615			
cttttgagca gccctcgctg gaacatgtcc tgccaccaag tgccagctcc ctctctgtct	2346		
gcaccaggga gtagtacccc cagctctgag aaagaggcgg catcccctag gccaagtgga	2406		
aagaggctgg ggttcccatt tgactccagt cccaggcagc catggggatc tcgggtcagt	2466		
tcagccttc ctctccaact cttcagccct gtgtttctgct ggggccatga aggcagaagg	2526		

9 / 27

tttagcctct gagaagccct cttcttcccc cacccttttc caggagaagg ggctgcccct 2586

ccaagcccta cttgtatgtg cggagtcaca ctgcagtgcc gaacagtatt agctcccgtt 2646

cccaagtgtg gactccagag gggctggagg caagctatga acttgctcgc tggcccaccc 2706

ctaagactgg taccatttc cttttcttac cctgatctcc ccagaagcct cttgtggtgg 2766

tggctgtgcc ccctatgccc tgtggcattt ctgcgtctta ctggcaacca cacaactcag 2826

ggaaaggaat gcctgggagt ggggggtgcag gcgggcagca ctgaggggacc ctgccccgcc 2886

ctcccccca ggcccctttc ccctgcagct tctcaagtga gactgacctg tctcaccag 2946

cagccactgc ccagccgcac tccaggcaag ggccagtgcg cctgctcctg accactgcaa 3006

tcccagcgcc caaggaaggc cacttctcaa ctggcagaac ttctgaagtt tagaattgga 3066

attacttcct tactagtgtc ttttggctta aattttgtct tttgaagttg aatgcttaat 3126

cccgggaaag aggaacagga gtgccagact cctggtcttt ccagtttaga aaaggctctg 3186

tgccaaggag ggaccacagg agctgggacc tgcctgcccc tgtcctttcc ccttggtttt 3246

gtgttacaag agttgttgga gacagtttca gatgattatt taatttgtaa atattgtaca 3306

1 0 / 2 7

aattttaata gcttaaattg tatatacagc caaataaaaaa cttgcattaa caaaaaaaaaa 3366

aaaaaaaaa 3374

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 617

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly

1 5 10 15

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr

20 25 30

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile

35 40 45

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val

50 55 60

Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg

65 70 75 80

1 1 / 2 7

Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg

85

90

95

Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe

100

105

110

Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu

115

120

125

Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu

130

135

140

Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr

145

150

155

160

His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe

165

170

175

Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr

180

185

190

Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys

195

200

205

Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val

210

215

220

1 2 / 2 7

Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe  
225 230 235 240

Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys  
245 250 255

Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met  
260 265 270

Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp  
275 280 285

Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg  
290 295 300

Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe  
305 310 315 320

Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala  
325 330 335

Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly  
340 345 350

Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn

1 3 / 2 7

355

360

365

Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu

370

375

380

Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser

385

390

395

400

Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg

405

410

415

Pro Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala

420

425

430

Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala

435

440

445

Gly Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro

450

455

460

Leu Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly

465

470

475

480

Phe Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu

485

490

495

1 4 / 2 7

Arg Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr

500

505

510

Leu Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu

515

520

525

Ala Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu

530

535

540

Gly Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro

545

550

555

560

Ser Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro

565

570

575

Glu Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met

580

585

590

Pro Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu

595

600

605

Gln Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His

610

615

&lt;210&gt; 3



1 5 / 2 7

&lt;211&gt; 3028

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (60).. (1910)

&lt;400&gt; 3

gcagtcgcgc ggattgagcg ggctcgcggc gctgggttcc tggctctcgg gccagggca 59

atg ttc cgc acg gca gtg atg atg gcg gcc agc ctg gcg ctg acc ggg 107

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly

1

5

10

15

gct gtg gtg gct cac gcc tac tac ctc aaa cac cag ttc tac ccc act 155

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr

20

25

30

gtg gtg tac ctg acc aag tcc agc ccc agc atg gca gtc ctg tac atc 203

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile

35

40

45

cag gcc ttt gtc ctt gtc ttc ctt ctg ggc aag gtg atg ggc aag gtg 251

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val

50

55

60

16 / 27

ttc ttt ggg caa ctg agg gca gca gag atg gag cac ctt ctg gaa cgt 299  
 Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80

tcc tgg tac gcc gtc aca gag act tgt ctg gcc ttc acc gtt ttt cgg 347  
 Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg  
 85 90 95

gat gac ttc agc ccc cgc ttt gtt gca ctc ttc act ctt ctt ctc ttc 395  
 Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe  
 100 105 110

ctc aaa tgt ttc cac tgg ctg gct gag gac cgt gtg gac ttt atg gaa 443  
 Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu  
 115 120 125

cgc agc ccc aac atc tcc tgg ctc ttt cac tgc cgc att gtc tct ctt 491  
 Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu  
 130 135 140

atg ttc ctc ctg ggc atc ctg gac ttc ctc ttc gtc agc cac gcc tat 539  
 Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr  
 145 150 155 160

cac agc atc ctg acc cgt ggg gcc tct gtg cag ctg gtg ttt ggc ttt 587

1 7 / 2 7

His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe

165

170

175

gag tat gcc atc ctg atg acg atg gtg ctc acc atc ttc atc aag tat 635

Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr

180

185

190

gtg ctg cac tcc gtg gac ctc cag agt gag aac ccc tgg gac aac aag 683

Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys

195

200

205

gct gtg tac atg ctc tac aca gag ctg ttt aca ggc ttc atc aag gtt 731

Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val

210

215

220

ctg ctg tac atg gcc ttc atg acc atc atg atc aag gtg cac acc ttc 779

Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe

225

230

235

240

cca ctc ttt gcc atc cgg ccc atg tac ctg gcc atg aga cag ttc aag 827

Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys

245

250

255

aaa gct gtg aca gat gcc atc atg tct cgc cga gcc atc cgc aac atg 875

Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met

260

265

270

1 8 / 2 7

aac acc ctg tat cca gat gcc acc cca gag gag ctc cag gca atg gac 923  
Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp  
275 280 285

aat gtc tgc atc atc tgc cga gaa gag atg gtg act ggt gcc aag aga 971  
Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg  
290 295 300

ctg ccc tgc aac cac att ttc cat acc agc tgc ctg cgc tcc tgg ttc 1019  
Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe  
305 310 315 320

cag cgg cag cag acc tgc ccc acc tgc cgt atg gat gtc ctt cgt gca 1067  
Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala  
325 330 335

tcg ctg cca gcg cag tca cca cca ccc ccg gag cct gcg gat cag ggg 1115  
Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly  
340 345 350

cca ccc cct gcc ccc cac ccc cca cca ctc ttg cct cag ccc ccc aac 1163  
Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn  
355 360 365

ttc ccc cag ggc ctc ctg cct cct ttt cct cca ggc atg ttc cca ctg 1211

19 / 27

Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu

370

375

380

tgg ccc ccc atg ggc ccc ttt cca cct gtc ccg cct ccc ccc agc tca 1259

Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser

385

390

395

400

gga gag gct gtg gct cct cca tcc acc agt gca gcc ctt tct cgg ccc 1307

Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Leu Ser Arg Pro

405

410

415

agt gga gca gct aca acc aca gct gct ggc acc agt gct act gct gct 1355

Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala

420

425

430

tct gcc aca gca tct ggc cca ggc tct ggc tct gcc cca gag gct ggc 1403

Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly

435

440

445

cct gcc cct ggt ttc ccc ttc cct cct ccc tgg atg ggt atg ccc ctg 1451

Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu

450

455

460

cct cca ccc ttt gcc ttc ccc cca atg cct gtg ccc cct gcg ggc ttt 1499

Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe

465

470

475

480

20 / 27

gct ggg ctg acc cca gag gag cta cga gct ctg gag ggc cat gag cgg 1547  
Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg  
485 490 495

cag cac ctg gag gcc cgg ctg cag agc ctg cgt aac atc cac aca ctg 1595  
Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu  
500 505 510

ctg gac gcc gcc atg ctg cag atc aac cag tac ctc acc gtg ctg gcc 1643  
Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala  
515 520 525

tcc ttg ggg ccc ccc cgg cct gcc act tca gtc aac tcc act gag ggg 1691  
Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly  
530 535 540

act gcc act aca gtt gtt gct gct gcc tcc tcc acc agc atc cct agc 1739  
Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser  
545 550 555 560

tca gag gcc acg acc cca acc cca gga gcc tcc cca cca gcc cct gaa 1787  
Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu  
565 570 575

atg gaa agg cct cca gct cct gag tca gtg ggc aca gag gag atg cct 1835

2 1 / 2 7

Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro

580

585

590

gag gat gga gag ccc gat gca gca gag ctc cgc cgg cgc cgc ctg cag 1883

Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln

595

600

605

aag ctg gag tct cct gtt gcc cac tga cactgccccca gccagcccc 1930

Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His

610

615

agcctctgct cttttgagca gccctcgtg gaacatgtcc tgccaccaag tgccagctcc 1990

ctctctgtct gcaccaggga gtagtaccce cagctctgag aaagaggcgg catcccctag 2050

gccaagtgga aagaggctgg ggttccatt tgactccagt ccaggcagc catggggatc 2110

tcgggtcagt tccagcttc ctctccaact cttcagccct gtgttctgct ggggccatga 2170

aggcagaagg tttagcctct gagaagccct cttcttcccc caccctttc caggagaagg 2230

ggctgcccct ccaagcccta cttgtatgtg cggagtcaca ctgcagtgcc gaacagtatt 2290

agctcccggtt cccaagtgtg gactccagag gggctggagg caagctatga acttgctcgc 2350

tgccccaccc ctaagactgg taccatttc ctttcttac cctgatctcc ccagaagcct 2410

2 2 / 2 7

cttgtggtgg tggctgtgcc ccctatgccc tgtggcattt ctgcgtctta ctggcaacca 2470

cacaactcag ggaaaggaat gcctgggagt gggggtgcag gcgggcagca ctgagggacc 2530

ctgccccgcc cctcccccca ggcccctttc ccctgcagct tctcaagtga gactgacctg 2590

tctcaccag cagccactgc ccagccgcac tccaggcaag ggccagtgcg cctgctcctg 2650

accactgcaa tcccagcgcc caaggaaggc cacttctcaa ctggcagaac ttctgaagtt 2710

tagaattgga attacttcct tactagtgtc ttttggtta aattttgtct tttgaagttg 2770

aatgcttaat cccgggaaag aggaacagga gtgccagact cctggtcttt ccagtttaga 2830

aaaggctctg tgccaaggag ggaccacagg agctgggacc tgccctgccc tgtcctttcc 2890

ccttggtttt gtgttacaag agttgttgga gacagtttca gatgattatt taatttgtaa 2950

atattgtaca aattttaata gcttaaattg tatatacagc caaataaaaa cttgcattaa 3010

caaaaaaaaa aaaaaaaaa 3028

<210> 4

<211> 616



2 3 / 2 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly

1

5

10

15

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr

20

25

30

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile

35

40

45

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val

50

55

60

Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg

65

70

75

80

Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg

85

90

95

Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe

100

105

110

Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu

2 4 / 2 7

115

120

125

Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu

130

135

140

Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr

145

150

155

160

His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe

165

170

175

Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr

180

185

190

Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys

195

200

205

Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val

210

215

220

Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe

225

230

235

240

Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys

245

250

255

25 / 27

Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met

260

265

270

Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp

275

280

285

Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg

290

295

300

Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe

305

310

315

320

Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala

325

330

335

Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly

340

345

350

Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn

355

360

365

Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu

370

375

380

Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser

385

390

395

400

26 / 27

Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Leu Ser Arg Pro

405

410

415

Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala

420

425

430

Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly

435

440

445

Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu

450

455

460

Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe

465

470

475

480

Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg

485

490

495

Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu

500

505

510

Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala

515

520

525

Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly

27 / 27

530	535	540
Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser		
545	550	555
		560
Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu		
	565	570
		575
Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro		
	580	585
		590
Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln		
	595	600
		605
Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His		
610	615	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011951

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, A01K67/027, C12N5/10, 15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, A01K67/027, C12N5/10, 15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genban/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/62841 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 15 August, 2002 (15.08.02), Full text & EP 1355935 A2 & EP 1385977 A2 & US 2004/0063924 A1 & AU 2002/247042 A1 & EP 1417224 A2	5-6, 8-18
X	WO 01/34629 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 17 May, 2001 (17.05.01), Full text & AU 2001/14735 A & EP 1244683 A & JP 2003-513655 A	5-6, 8-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 November, 2004 (15.11.04)

Date of mailing of the international search report  
07 December, 2004 (07.12.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/011951

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/038038 A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 08 May, 2003 (08.05.03), Full text & AU 2002/348034 A1	5-6, 8-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/011951

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-4, 7  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1 to 4 and 7 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This international application covers an invention relating to the use of synoviolin in treatment of hematopoietic diseases (invention of claims 5, 6 and 8) and inventions relating to a hematopoietic disease model nonhuman animal fetus with synoviolin gene function deficiency, cell derived from the same and a method of screening a therapeutic agent for hematopoietic diseases with the use of these (inventions of claims 9-18). However, since the use of synoviolin being a protein consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO. 2 in hematopoietic diseases is publicly known as described in the cited literature, this feature cannot be recognized as a technical feature (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/015951

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

contributory over the prior art and cannot be stated as sharing special technical features. Therefore, it does not appear that these invention groups are linked with each other so as to form a single general inventive concept.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K 38/00, A01K 67/027, C12N 5/10, 15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K 38/00, A01K 67/027, C12N 5/10, 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq,  
Genban/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/62841 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 2002.08.15, 全文 &EP 1355935 A2 &EP 1385977 A2 &US 2004/0063924 A1 &AU 2002/247042 A1 &EP 1417224 A2	5-6, 8-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.11.2004

国際調査報告の発送日

07.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子

4C

9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/34629 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001.05.17, 全文 &AU 2001/14735 A &EP 1244683 A &JP 2003-513655 A	5-6, 8-18
X	WO 03/038038 A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2003.05.08, 全文 &AU 2002/348034 A1	5-6, 8-18

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-4, 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲 1-4, 7 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

この国際出願は、シノビリオンの造血系疾患の治療への適用に関する発明 (請求の範囲 5, 6, 8 に記載の発明)、シノビリオン遺伝子機能が欠損している、造血系疾患モデル非ヒト動物胎仔とこれに由来する細胞、及び、これらを用いた造血系疾患の治療剤のスクリーニング方法に関する発明 (請求の範囲 9-18) を包含するが、引用文献に記載されているとおり、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質であるシノビリオンが、造血系疾患の治療に用いられることは公知であるから、この点を、先行技術に対して貢献する技術的特徴と認めることはできず、特別な技術的特徴を共有するものとは言えないから、これらの発明群は単一の一般的発明概念を形成するように連関しているとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**